



# Validation des outils immunotoxicologiques pour l'étude des effets biologiques des contaminants du milieu marin

Matthieu Duchemin

## ► To cite this version:

Matthieu Duchemin. Validation des outils immunotoxicologiques pour l'étude des effets biologiques des contaminants du milieu marin. Biologie cellulaire. Université de Bretagne occidentale - Brest; Institut National de la Recherche Scientifique, 2007. Français. NNT: . tel-00256657

**HAL Id: tel-00256657**

**<https://theses.hal.science/tel-00256657>**

Submitted on 16 Feb 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

---

# VALIDATION DES OUTILS IMMUNOTOXICOLOGIQUES POUR L'ETUDE DES EFFETS BIOLOGIQUES DES CONTAMINANTS CHIMIQUES EN MILIEU MARIN

---

*Thèse présentée par*

**MATTHIEU DUCHEMIN**

POUR

LE DOCTORAT D'OCEANOLOGIE BIOLOGIQUE – ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA MER –  
UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ET

LE DOCTORAT EN BIOLOGIE DE L'INSTITUT ARMAND FRAPPIER – INSTITUT NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE – UNIVERSITE DU QUEBEC

*Soutenue le 7 mars 2007*

*À l'Institut Universitaire Européen de la Mer*

## **Devant le jury composé de :**

- ✦ FOURNIER Michel, Docteur en Immunologie, professeur à l'Institut Armand Frappier, Institut National de la Recherche Scientifique, titulaire de la Chaire de recherche du Canada en immunotoxicologie de l'environnement
- ✦ FORMISYN Pascal, Docteur en Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, professeur à l'Ecole des Mines de St Etienne
- ✦ LAROCHE Jean, Docteur en Biologie, professeur à l'Université de Bretagne Occidentale, Institut Universitaire Européen de la Mer, Laboratoire des Sciences de l'environnement marin
- ✦ AUFFRET Michel, Docteur en Océanographie biologie, maître de conférences HDR l'Université de Bretagne Occidentale, Institut Universitaire Européen de la Mer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin
- ✦ BURGEOT Thierry, Docteur en Chimie Biologie spécialité écotoxicologie, HDR, chargé de recherches à l'IFREMER, Département Biogéochimie et Écotoxicologie



« L'huître, elle aussi a des ennemis »

*Alexis Tolstoï - **Kosma Proutkov** (merci Béatrice)*

« Homme libre, toujours tu chériras la mer !  
La mer est ton miroir ; tu contemples ton âme  
Dans le déroulement infini de sa lame,  
Et ton esprit n'est pas un gouffre moins amer ... »

*Charles Baudelaire - **Les Fleurs du mal** (1855)*

The Sun now rose upon the right:  
Out of the sea came he,  
Still hid in the mist, and on the left  
Went down into the sea.  
[...]  
And I had done a hellish thing,  
And it would work'em woe:  
For all averred, I had killed the bird  
That made the breeze to blow.  
Ah wretch! Said they, the bird to slay,  
That made the breeze to blow!  
[...]  
Day after day, day after day,  
We stuck, nor breath nor motion;  
As idle as a painted ship  
Upon a painted ocean.

Water, water, every where,  
And all the boards did shrink;  
Water, water, every where,  
Nor any drop to drink.

*Samuel T. Coleridge - **The Rime of the Ancient Mariner**  
(1798)*



## **Remerciements**

Nous sommes tous le produit de nos expériences et de nos rencontres. Les bénéficiaires qui en sont tirés peuvent modifier, sans en être la volonté première, la stratégie pour atteindre nos objectifs. Mais, tant d'histoires vécues et tant de personnes rencontrées ces trois dernières années que remercier, en seulement quelques pages, les personnes qui ont su me redonner confiance dans les moments de doute, du courage quand je fléchissais, des idées, ou remarques, quand je piétinais, risque de vexer par omission. Alors d'une phrase je veux tous les remercier du fond du cœur, qu'ils soient collègues, amis ou famille, ou encore simple rencontre du hasard, en France ou au Québec.

Toutefois, le travail de doctorat s'intègre dans une structure de recherche. Tout d'abord, le directeur de recherche encadre le projet et a le rôle privilégié de conseiller expérimenté pour toutes les questions administratives ou scientifiques qui entourent un doctorat. Je tiens ici à remercier très sincèrement Michel Auffret et Michel Fournier pour ce rôle qu'ils ont bien voulu assumer pendant trois ans. Etre encadré par deux directeurs, pour un seul sujet, peut être un signe ostensible de richesse, mais avant tout, c'est le gage de bénéficier de toute l'expérience de chacune de ces deux personnalités de recherche différentes. Afin de suivre l'état d'avancement des tâches fixées par ce projet de recherche, un comité de thèse a été constitué. Le travail effectué pour répondre aux exigences de ce comité, ainsi que les remarques et suggestions qui y ont été faites par ses membres, ont contribué largement à l'atteinte des objectifs de ce travail. Le comité de thèse était composé des directeurs de recherche et de deux rapporteurs externes. Je remercie volontiers ces derniers en les personnes du Dr Thierry Burgeot de l'IFREMER et du Dr Pascal Formisyn de l'école des mines de Saint Etienne d'avoir accepté ce rôle. Je remercie également Dr Jean Laroche, de l'Université de Bretagne Occidentale, d'avoir bien voulu participer au jury d'évaluation de ce travail. Un projet de recherche ne pourrait pas atteindre ses objectifs s'il n'y avait pas ni soutien technique ni soutien logistique. Marlène, Sophie, Louis, Nelly, Alain(s), Réal, JB, Florent, Héloïse, Jocelyne et Gene par leur expérience et dévouement, ont permis aux expérimentations de se dérouler dans les meilleures conditions au Québec, comme en France. Je veux aussi remercier la Marine Nationale pour son concours logistique et technique aux expérimentations menées dans la Penfeld. Je tiens également à remercier Dre. Jocelyne Pellerin, de l'Institut des Sciences de la MER à l'Université du Québec à Rimouski pour

l'accueil dans son laboratoire et le soutien logistique qu'elle a fourni pendant les expérimentations effectuées à Rimouski. Enfin, la qualité d'un projet de recherche dépend de la qualité de son environnement scientifique. Ayant effectué ce doctorat entre deux continents, j'ai eu la chance d'être confronté à plusieurs environnements fortement motivants. Ainsi, la transdisciplinarité du Laboratoire des Sciences de l'environnement marin et de l'Institut Universitaire Européen de la Mer, en France, a été une source de richesse créative pour ce travail. De même, c'est avec joie que j'ai pu retrouver, après l'avoir quitté en décembre 2001, l'ISMER et son interdisciplinarité. La diversité d'approche des processus biologiques cellulaires qui réside à l'Institut Armand Frappier, que ce soit pour l'immunologie, la toxicologie environnementale ou l'écotoxicologie n'a pas à rougir devant cette diversité de disciplines chère aux sciences de la mer ; l'incubateur d'idées nouvelles a très bien su fonctionner, aussi à Pointe-Claire. Finalement, un environnement de recherche ne saurait être agréable, et donc productif, sans une dynamique positive menée par les étudiants de maîtrise, de doctorat, ou tout simplement stagiaires de ces instituts, notamment Noel, Morgane, Pierro, Jona, Sorcha, Briva, Joelle et les autres. Je les en remercie très sincèrement. Le doctorat peut aussi être l'occasion d'établir le lien entre connaissance et société en faisant « acte de formation ». Je tiens alors à remercier Dr Yves-Marie Paulet de m'avoir offert cette opportunité auprès des licences (L3) et des maîtrises (M1). Comme la formation est avant tout une relation, et un échange, entre des personnes, je veux exprimer toute ma gratitude envers Isabel, Cécile, Laetitia, Audrey, Nathalie, Aurore et Tristan pour l'expérience personnelle, mais aussi pour la réflexion sur mon sujet, que j'ai pu tirée de leur encadrement.

Enfin, dans un contexte qui appelait des missions de part et d'autre de l'Atlantique, j'ai pu apprécier le dévouement d'amis qui resteront chers à mes yeux. Au gang de chums de Rimouski, à Sophie, Joanna et Benjamin, un gros, gros merci pour votre aide et votre amitié. Il est bon de terminer sur une note douce et sucrée. Je veux maintenant exprimer toute mon affection à mes parents et à mes frères et sœurs pour leur soutien sans faille, à ma belle-famille pour leur disponibilité. Tout particulièrement, je veux souligner l'importance de mon épouse, Sandrine, et de mes deux filles, Emeline et Léonie, d'avoir su maintenir ma motivation à son plus haut niveau. Qu'elles reçoivent ma plus profonde affection en remerciement de leur amour, de leurs sourires, de leurs premiers maux et de leurs premiers mots.

Ces travaux de thèse ont reçu le soutien financier de la commission européenne (Programme environnement et développement durable), du Ministère de l'Ecologie et du

Développement Durable, du réseau d'innovation et technologies de la mer (RITMER), de la commission franco-qubécoise, de la coopération interuniversitaire France Québec, du Conseil Général du Finistère, des relations internationales de l'Institut Universitaire Européen de la Mer, de l'Université de Bretagne Occidentale, de la Région Bretagne (France), du Réseau d'Écotoxicologie du Saint Laurent, du Réseau d'Aquaculture du Québec et de Québec Océan.



## **Résumé des travaux**

Les activités industrielles, agricoles ou urbaines de l'homme exercent une pression chimique sur l'environnement marin. Lors d'accidents, mais le plus souvent lors de contaminations chroniques des effluents anthropiques, cette pression peut engendrer des effets toxiques de l'échelle moléculaire à l'échelle écosystémique perturbant le fonctionnement de l'écosystème marin côtier. Le risque environnemental de ces substances chimiques est caractérisé à l'aide de biomarqueurs. Ces outils permettent la détection de ces polluants ou de leurs effets toxiques, la prédiction de ces effets sur les écosystèmes et la surveillance de leur évolution. Depuis une vingtaine d'années les biomarqueurs du système immunitaire sont utilisés pour diagnostiquer des effets immunotoxiques de nombreux groupes de polluants, sur plusieurs espèces sentinelles des écosystèmes terrestres et aquatiques, notamment chez les bivalves. Néanmoins, plusieurs facteurs endogènes et environnementaux peuvent moduler le fonctionnement du système immunitaire d'un individu et ainsi confondre le signal immunotoxique du polluant. Dans le cadre d'une collaboration franco-canadienne entre deux réseaux de recherche en écotoxicologie, le Réseau de recherche en écotoxicologie du Saint Laurent (RRESL) et le groupement de recherche « interactions moléculaires et physiologiques des contaminants du milieu marin (GDR IMOPHYS), ce travail de doctorat s'est attaché à étudier l'impact de certains facteurs confondants, en vue de valider l'utilisation de l'outil immunotoxicologique dans l'évaluation du risque environnemental en milieu marin.

La stratégie de l'étude s'est orientée selon trois axes, en utilisant deux espèces modèles communes dans l'évaluation environnementale de l'écosystème marin, de par leurs caractéristiques écologiques et leur importance économique, l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et la moule bleue, *Mytilus edulis*. Un premier axe méthodologique s'est attaché à comparer différentes techniques et méthodes d'analyses des paramètres des cellules de la défense immunitaire chez les bivalves, les hémocytes, à développer un nouveau protocole d'exposition individuelle et à mettre au point un indice global de la réponse immunotoxique. Un second axe, écophysiologique, a cherché à étudier l'impact des facteurs endogènes et saisonniers sur le fonctionnement individuel du système immunitaire chez ces deux espèces de bivalves. Un dernier axe, a enfin étudié l'impact de ces facteurs confondants sur le signal immunotoxique émis par des xénobiotiques caractérisant des activités anthropiques, en condition d'exposition individuelle.

L'axe méthodologique a montré l'importance critique du site anatomique de prélèvement des hémocytes pour des études immunotoxicologiques. À la suite d'ateliers internationaux d'harmonisation de méthodes d'analyses des paramètres immunitaires, un ensemble de protocoles, à standardiser, a été proposé dans le cadre de suivi de sites ateliers d'un réseau de recherche transatlantique en écotoxicologie (Réseau de Recherche sur les bivalves). Un indice cumulé immunotoxicologique a été développé, offrant une vision globale de la réponse immunotoxique. Enfin, cet axe a permis la mise au point un nouveau protocole opérationnel d'exposition individuelle, adapté à l'évaluation du risque chimique en milieu marin, autorisant une standardisation des conditions d'exposition, l'ajout de la mesure d'un trait de vie adapté à des expositions aiguës ou chroniques et l'augmentation de la sécurité chimique pour l'utilisateur.

Dans le deuxième axe écophysiologique, chez *Crassostrea gigas*, comme chez *Mytilus edulis*, les paramètres immunitaires ont montré des variations saisonnières. Ces variations sont nettement marquées pour la fonction de phagocytose, allant du simple au double. Le minimum de phagocytose coïncidait à la période de ponte chez des huîtres diploïdes, chez des individus dont le cycle reproducteur était artificiellement modifié, des triploïdes, et également chez les moules qui pondent deux fois dans un cycle saisonnier. Grâce à l'observation histologique des gonades, le sexe est apparu comme un facteur confondant significatif pouvant induire des différences d'immunocompétence de 20%-30% entre les mâles et les femelles. De même, alors que les eaux se réchauffent, la diminution progressive des paramètres immunitaires, jusqu'à la ponte, s'explique par le développement des gamètes. Par contre, l'évolution saisonnière des paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau n'a révélé que peu moduler la réponse immunitaire.

Enfin, le dernier axe a montré que le signal immunotoxique de polluants pouvait être brouillé en ne discriminant pas les individus testés selon leur sexe. De même, la sensibilité immunotoxiques aux polluants changer radicalement, selon le cycle reproducteur et les autres facteurs saisonniers. L'importance de ces facteurs confondants dans l'évaluation environnementale d'activités anthropiques croissantes ou rythmiques a été mise en évidence avec des doses de polluants actuellement mesurés dans l'environnement, seuls ou en mélanges.

Par cette approche méthodologique, écophysiologique et écotoxicologique des biomarqueurs du système immunitaire, ce travail de recherche appliquée a finalement, contribué à progresser dans la validation et l'utilisation des outils immunotoxicologiques pour

l'évaluation du risque chimique et environnementale en milieu marin. D'autres facteurs biologiques pourraient également confondre le signal immunotoxique et le passage à une échelle plus grande de conditions contrôlées est maintenant possible. Mais ces résultats ouvrent également des perspectives de recherche plus fondamentales sur le rôle des hémocytes dans la physiologie des bivalves et la régulation de la fonction neuro-immuno-endocrine. Les résultats obtenus pourront permettre une gestion pragmatique, durable et objective des activités anthropiques qui perturbent chimiquement le milieu marin côtier. La filière conchylicole pourra également chercher à appliquer ces nouvelles connaissances sur la qualité du milieu et de la ressource biologique au profit de l'amélioration de la qualité de la production, par exemple.



## **Table des matières**

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>V</b>
<b>RESUME DES TRAVAUX</b>	<b>VIII</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>XII</b>
<b>TABLES DES FIGURES</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>XVIII</b>
<b>COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES ISSUES DES TRAVAUX PRESENTES</b>	<b>XIX</b>

### **CHAPITRE 1. CONTEXTE DE L'ETUDE** **23**

### **CHAPITRE 2. REVUE DE LITTERATURE** **33**

<b>I. PRESENTATION DU CHAPITRE</b>	<b>35</b>
<b>II. LES XENOBIOTIQUES PRESENTS DANS LE MILIEU MARIN</b>	<b>36</b>
<b>III. LES MODELES BIOLOGIQUES ETUDIES</b>	<b>50</b>
<b>IV. LES HEMOCYTES, CELLULES CIRCULANTES ET PLURIPOTENTES CHEZ LES BIVALVES</b>	<b>59</b>
<b>V. LE SYSTEME IMMUNITAIRE DES BIVALVES</b>	<b>63</b>
<b>VI. IMMUNOTOXICOLOGIE ET SANTE DE L'ENVIRONNEMENT</b>	<b>67</b>

### **CHAPITRE 1. DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE** **75**

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>77</b>
<b>II. COMPARAISON DES PARAMETRES IMMUNITAIRES D'HEMOCYTES PRELEVES DANS LA CAVITE PERICARDIQUE ET DANS LE SINUS DU MUSCLE ADDUCTEUR CHEZ L'HUITRE CREUSE, CRASSOSTREA GIGAS, PAR L'UTILISATION DE DEUX CYTOMETRES</b>	<b>79</b>
<b>III. ÉTUDES D'HARMONISATION DES METHODES D'ANALYSE DES PARAMETRES IMMUNITAIRES</b>	<b>93</b>
<b>IV. INDICATEUR DE LA CONDITION PHYSIOLOGIQUE GLOBALE D'UN INDIVIDU ET DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU PROTOCOLE D'EXPOSITION INDIVIDUELLE</b>	<b>110</b>
<b>V. APPLICATION DU NOUVEAU PROTOCOLE D'EXPOSITION « IN TUBO » : APPROCHE COMPARATIVE D'UNE EXPOSITION AU CHLORURE DE MERCURE</b>	<b>119</b>
<b>VI. OUTILS D'ANALYSE EN IMMUNOTOXICOLOGIE</b>	<b>139</b>
<b>VII. SYNTHESE</b>	<b>163</b>

### **CHAPITRE 4. IMPACT DES FACTEURS SAISONNIERS ET ENDOGENES** **164**

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>165</b>
------------------------	------------

<b>II. ÉTUDE DES VARIATIONS SAISONNIERES DES PARAMETRES IMMUNITAIRE EN FONCTION DU SEXE, DU STADE DE MATURATION ET DE LA PLOÏDIE CHEZ L’HUITRE CREUSE, CRASSOSTREA GIGAS</b>	<b>166</b>
<b>III. IMPACT DE LA REPRODUCTION ET DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX SUR LES VARIATIONS SAISONNIERES DES PARAMETRES IMMUNITAIRES CHEZ LA MOULE, MYTILUS EDULIS</b>	<b>182</b>
<b>IV. VALEURS SYNTHETIQUES DES PARAMETRES IMMUNITAIRES CHEZ LES BIVALVES</b>	<b>195</b>
<b>V. SYNTHÈSE</b>	<b>197</b>
<b><i>CHAPITRE 5. IMPACT DES XENOBIOTIQUES</i></b>	<b>199</b>
<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>201</b>
<b>II. IMPACTS IMMUNOTOXIQUES DES ACTIVITES ANTHROPIQUES EN MILIEU MARIN</b>	<b>202</b>
<b>III. SYNTHESE</b>	<b>223</b>
<b><i>CHAPITRE 6. DISCUSSION GENERALE</i></b>	<b>225</b>
<b>I. DU DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE</b>	<b>226</b>
<b>II. DE L’IMPACT DES FACTEURS ENDOGENES ET SAISONNIERS</b>	<b>229</b>
<b>III. DES IMPACTS DES XENOBIOTIQUES DES ACTIVITES ANTHROPIQUES</b>	<b>232</b>
<b>IV. RECOMMANDATIONS POUR L’EVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL UTILISANT LES OUTILS IMMUNOTOXICOLOGIQUES</b>	<b>233</b>
<b><i>CHAPITRE 7. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</i></b>	<b>241</b>
<b>I. CONCLUSIONS DE L’ETUDE</b>	<b>243</b>
<b>II. PERSPECTIVES DE L’ETUDE</b>	<b>245</b>
<b><i>BIBLIOGRAPHIE</i></b>	<b>249</b>
<b><i>ANNEXES</i></b>	<b>277</b>

## Tables des figures

<i>Figure 1.1 : Le paradigme de la recherche, de l'analyse du risque et de la gestion du risque (d'après Formisyn, 2001 (IPCS, 2001)).....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 1.2: Schéma conceptuel des facteurs d'impact sur les paramètres immunitaires. ....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 2.1: Schémas des pertes de pesticides dans l'environnement pendant les épandages et des voies et mécanismes de dispersion des pesticides dans les écosystèmes aquatiques (Savini, 2005).....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 2.2 : Evolution des tonnages de substances actives vendues en France entre 1990 et 2004 (Source UIPP, "Les chiffres clés" 2004 in Savini, 2005) .....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 2.3 : Diversité des activités industrielles dans les zones côtières de l'Europe de l'Ouest (source : Bilan de santé OSPAR, 2000).....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 2.4 : Rejets totaux, en tonnes, d'hydrocarbures liés à l'industrie pétrolière, par pays entre 1984 et 2003. D'après (OSPAR, 2006).....</i>	<i>46</i>
<i>Figure 2.5 : Distribution des PCB en zone arctique (Agence Environnementale Européenne 2005) .....</i>	<i>47</i>
<i>Figure 2.6: Production conchylicole au Canada et en Europe. Historique de la production totale de Mollusques, d'huîtres et de moules au Canada (A.) et en Europe (B.). Production conchylicole en 2004 au Canada et dans les pays européens et répartition par espèces produites en France et au Canada (C.). D'après les données brutes du Fisheries Global Information System (FIGIS, 2006). ....</i>	<i>52</i>
<i>Figure 2.7: Crassostrea gigas (Thunberg, 1793) (source : <a href="http://www.fao.org">www.fao.org</a> accédé le 12 septembre 2006) .....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 2.8: Répartition géographique de l'espèce Crassostrea gigas (Thunberg, 1793) production et introduction d'individus réunis (source : <a href="http://www.fao.org">www.fao.org</a> accédé le 12 septembre 2006). ....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 2.9: La moule, Mytilus edulis (Linné, 1758) et Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819) (source : <a href="http://www.fao.org">www.fao.org</a> accédé le 12 septembre 2006) .....</i>	<i>56</i>
<i>Figure 2.10 : Répartition géographique de l'espèce Mytilus edulis et galloprovincialis production et population naturelles réunies (source : <a href="http://www.fao.org">www.fao.org</a> accédé le 12 septembre 2006). ....</i>	<i>56</i>
<i>Figure 2.11 : Schéma de l'appareil circulatoire semi-ouvert chez les bivalves. Il est discontinu au niveau de sinus. L'hémolymph est le tissu dans lequel circulent les hémocytes. Des hémocytes ont également migré dans le sinus péricardique par diapédèse (in Gosling, 2003 d'après Bolledail et al., 1961).....</i>	<i>58</i>
<i>Figure 2.12 : Observations par microscopie optique de préparation d'hémocytes. Les barres représentent 10µm (a – c). Les hémocytes ont été cytocentrifugés puis colorés par la coloration de Wright. H, hyalinocytes ; E, granulocyte éosinophile ; B, granulocyte basophile; TIII, hémocytes éosinophile de type III. (a) M. edulis, (b) E. siliqua et (c) C. edule. (d–f) Monocouche d'hémocytes ayant phagocytés du zymosan (flèche). (d) M. edulis, (e) E. siliqua et (f) C. edule (in Wootton et al, 2003). ....</i>	<i>61</i>
<i>Figure 2.13 : Photographies d'imagerie confocale démontrant la présence de défensines marquées au FITC (A) et de mytilines marquées au rouge texan (B). C montre la présence conjointe des peptides antibactériens dans des compartiments cytosoliques différents (flèche bleue) ou identique (flèche jaune). Certains hémocytes ne contiennent ni de défensines ni de mytilines (flèche blanche). In (Mitta et al., 2000) .....</i>	<i>66</i>

Figure 2.14: Schéma du principe de la cytométrie en flux. Chaque cellule entraînée dans le flux est excitée par un LASER. La taille et la complexité de l'événement sont enregistrées sur les capteurs FSCF et SSC. La fluorescence naturelle ou d'une sonde associée à une structure cellulaire est mesurée sur des photomultiplicateurs. L'ensemble des données est ensuite analysé par un logiciel dédié (d'après PUCL, <a href="http://www.cyto.purdue.edu">www.cyto.purdue.edu</a> ).....	74
Figure 3.1 : THC, hemolymph volume and total number of cells for pericardial cavity and muscle samples. N= 6 replicates; standard error is presented. ***: $p<0.001$ .....	89
Figure 3.2 : hemocyte activities monitored on both flow cytometers (Beckman and Becton) and both collection sites (pericardial cavity and muscle samples): hemocyte mortality (a), phagocytic index (b), percentage of ROS positive cells (c), percentage of esterase positive cells (d) and percentage of lysosome positive cells (e). N = 3 replicates; standard error is presented. * represents a significant difference between pericardial cavity and muscle hemocytes. **: $p<0.01$ . a represents a significant difference between Beckman and Becton flow cytometers. a: $p<0.05$ ; aaa: $p<0.001$ .....	90
Figure 3.3 : hemocyte phagocytic capacity (HPC) of hemocytes sampled from the pericardial cavity and the adductor muscle sinus. These data have only been collected with the FacsCalibur®.....	91
Figure 3.4 : histogram of fluorescence of ingested latex beads obtained with the EPICS XL4® cytometer (left) and the FacsCalibur® cytometer (right) showing the number of hemocytes having engulfed three beads and more (M2). M1 is the marker used for the calculation of HPC.....	91
Figure 3.5 : Sub populations' pattern of hemocytes (R1, R2, and R3) in the pericardial cavity or in the adductor muscle sinus discriminated with fluoresceine diacetate (FDA) measured on the FL-1 and scatter light (SSC)...	92
Figure 3.6 : Phagocytic index of haemocytes of <i>Mytilus edulis</i> facing a same in vitro mercury challenge through four flow cytometric (FCM 1, FCM 1 mod, FCM 2, and FCM 3) methods and one microplate reader (MPR) method. The curves are the adjustment of the weighed mean squared. ....	107
Figure 3.7 : Phagocytic index of haemocytes of <i>Mytilus edulis</i> facing in vitro mercury challenges through three flow cytometric (FCM 1 mod, FCM 2, and FCM 3) methods and two microplate reader (MPR1 and MPR 2) methods performed in five different laboratories.....	108
Figure 1.8 : FCM histograms of haemocytes in phagocytosis. M2 and M3 are markers to calculate the phagocytic index of 1 bead and more (M3) or three beads and more (M1). M2 gives the fluorescence of one bead in order to calculate the haemocyte phagocytic capacity. The (-) histogram is obtained from control samples, the (--) histogram from $10^{-6}M$ of $HgCl_2$ and the (-) histogram from $10^{-3}M$ of $HgCl_2$ .....	109
Figure 1.9 : Algal reduction of 30 mL of four different initial concentrations of T-iso in tubes filled in each with a mussel and measured with a cell counting chamber (Malassez). Each point is the mean of algal concentration of five tubes. ....	116
Figure 1.10 : Algal reduction measured with a cell counting chamber (Malassez) for different time of incubation in tubes filled in each with a mussel. Each point is the mean of algal concentration of five mussels fed with 30 mL of T-iso. ....	117
Figure 1.11 : Haemocyte mortality (A.) and phagocytic index (B.) of mussels (5 per group) after different times of incubation in tubes. The bars are the standard deviation and the star (*) indicates significant differences at p	



< 0.1.....	118
Figure 1.12 : Scheme of the in tubo experimental system. Mussels were individually placed into a tube filled with the working solution. Each tube is an experimental unit and is partially emerged in an open water tank which serves as a thermostat. One tube is filled with control solution only to monitor the temperature. ....	126
Figure 1.13 : THC (A.), haemocyte mortality (B.), and phagocytic index (C.) of mussels exposed in vivo to HgCl <sub>2</sub> for 28 days. Each curve corresponds to a treatment. Points represent the mean of all individuals of the 4 replicates. Bars are the confidence interval at 95% and stars (*) indicate significant differences at $p = 0.05$ from the control. ....	132
Figure 1.14 : Immune parameters and clearance rate of N individuals after 24 hours of in tubo exposure to HgCl <sub>2</sub> (A. THC; B. Haemocyte mortality; C. Phagocytic index; D. HPC; E. Clearance rate). The results of five experiments are reassembled. Bars are the confidence interval at 95%. Different letters indicate significant differences at $p = 0.05$ (ANOVA or Kruskal-Wallis test for THC). ....	133
Figure 1.15 : Dose-response curve of the phagocytic index (A.) and the haemocyte phagocytic capacity (B.) of 3-hours in vitro exposure to HgCl <sub>2</sub> of haemocytes of the blue mussel over five replicated experiments. Each point is the mean value of the relative value to the control for each experiment and bars are the standard deviation of the relative value to the control of each experiment. Each experiment exposed pool of hemolymph collected from 10 individuals. ....	134
Figure 4.1 : Immune parameters variations (A, THC; B, haemocyte mortality; C, phagocytic index) analysed during 15 months from May 2003 to August 2004 of diploid and triploid Pacific oysters. May and July are duplicated and no data have been sampled in November 2003. Arrows indicate the time of spawning in 2003. Points represent the mean value of the parameter for all the individuals of a month. Vertical bars represent the standard deviation. Stars (*) or letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Statistical analyses are detailed in the text. ....	180
Figure 4.2: Immune parameters variations (A, THC; B, haemocyte mortality; C, phagocytic index) regarding cytogenetic status, sex and gametogenic stages. Data were obtained from individuals sampled from May 2004 to August 2004. Bars represent the mean value for a maturation stage. Vertical bars represent the standard deviation. Stars (*) indicates significant differences ( $p < 0.05$ ). Statistical analyses are detailed in the text. ....	181
Figure 4.3: Histogramme empilé des fréquences des stades de maturation des femelles, entre mars 2005 et mai 2006, chez <i>Mytilus edulis</i> , à la Pointe du Diable (France). ....	188
Figure 4.4: Histogramme empilé des fréquences des stades de maturation des mâles, entre mars 2005 et mai 2006, chez <i>Mytilus edulis</i> , à la Pointe du Diable (France). ....	188
Figure 4.5: Seasonal variations of immune parameters in <i>Mytilus edulis</i> from February 2005 to May 2006. A. THC; B. haemocyte mortality; C. phagocytic index; D. HPC. Grey bars: spawning period. ....	189
Figure 4.6: Seasonal variations of seawater parameters from February 2005 to May 2006 with MAREL-Iroise data buoy. A. O <sub>2</sub> ; B. Chla; C. temperature; D. Salinity. Grey bars: spawning period. ....	189
Figure 5.1 : Diagram of gametogenic stages of all individuals sampled for each exposure in October 2004 and in June 2005. ....	216
Figure 5.2 : THC, haemocyte mortality, phagocytic index, and HPC immunotoxic effects of TBT on individually	

- exposed mussels for 24 h regarding seasons and sex. Latin letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) within a dose-response curve. .... 217
- Figure 5.3 : Clearance rate and immunotoxic effects of atrazine on individually exposed mussels for 24 h regarding seasons and sex. A. Clearance rate. B. Total Haemocyte Counts. C. Haemocytes mortality. D. Phagocytic index. E. Haemocytes Phagocytic Capacity. Latin letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) within a dose-response curve. Stars (\*) indicate significant CTR seasonal differences and crosses († and ‡) indicate significant sex differences. .... 218
- Figure 5.4: Clearance rate and immunotoxic effects of diuron on individually exposed mussels for 24 h regarding seasons and sex. A. Clearance rate. B. Total Haemocyte Counts. C. Haemocytes mortality. D. Phagocytic index. E. Haemocytes Phagocytic Capacity. Latin letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) within a dose-response curve. Stars (\*) indicate significant CTR seasonal differences and crosses († and ‡) indicate significant sex differences. .... 219
- Figure 5.5 : Clearance rate and immunotoxic effects of E2 on individually exposed mussels for 24 h regarding seasons and sex. A. Clearance rate. B. Total Haemocyte Counts. C. Haemocytes mortality. D. Phagocytic index. E. Haemocytes Phagocytic Capacity. Latin letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) within a dose-response curve. Stars (\*) indicate significant seasonal differences (October 2004 and June 2005) for same dose and sex. Crosses († and ‡) indicate significant sex differences. .... 220
- Figure 5.6 : THC (A), haemocyte mortality (B), Phagocytic index (C), and HPC (D) of 15 mussels challenging different anthropogenic mixtures of TBT, atrazine, diuron and E2. Bars are the confidence interval at 95%. Stars (\*) and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). .... 221

## **Liste des tableaux**

<i>Tableau 1: Facteurs affectant la validité et la faisabilité des études avec des biomarqueurs : procédures analytiques (IPCS, 2001) .....</i>	<i>30</i>
<i>Tableau 2: Facteurs affectant la validité des biomarqueurs: caractéristiques intrinsèque du biomarqueur (IPCS, 2001) .....</i>	<i>30</i>
<i>Tableau 3 : Critères de sélection des caractéristiques des substances chimiques en vigueur en Europe, selon le Technical Guidance Document (TGD) et au Canada, selon la Loi Canadienne de Protection de l'Environnement (LCPE) (Environnement Canada, 2004; Marchand et Tissier, 2005). .....</i>	<i>39</i>
<i>Tableau 4: Principaux produits pharmaceutiques, cosmétiques et vétérinaires mesurés dans les effluents urbains et leur utilisation (d'après Ellis, 2006) .....</i>	<i>49</i>
<i>Tableau 5: Exemples de substances chimiques, par classe, pouvant induire des effets immunotoxiques (Galloway et Depledge, 2001) .....</i>	<i>69</i>
<i>Table 6 : Summary of the number of mussels used for each exposure protocol. ....</i>	<i>125</i>
<i>Table 7 : Cumulative number of dead mussels after 28 days of in vivo exposure to HgCl<sub>2</sub> among the four replicates.....</i>	<i>131</i>
<i>Tableau 8 : Mean and standard deviation of the immune parameters regarding sex and cytogenetic status. Data were obtained from individuals sampled from May 2004 to August 2004. Statistical analyses are detailed in the text.....</i>	<i>179</i>
<i>Table 9 : Immune endpoints values of Mytilus edulis females and males measured along a 16-month survey. Star (*) indicates a significant difference from analysis of variance or Mann-Whitney test at p = 0.05. ....</i>	<i>190</i>
<i>Tableau 10 : Moyennes et valeurs des paramètres immunitaires (THC, mortalité hémoducytaire, indice phagocytaire et HPC) chez 50% d'une population d'huîtres creuses (Crassostrea gigas) élevées à Belon, entre mai 2003 et août 2004, d'une population sauvage de moules bleues (Mytilus edulis) de la Pointe du Diable (Rade de Brest, France), entre février 2005 et mai 2006, et enfin d'une autre population sauvage de moules bleues, à Métis (Québec), échantillonnées hebdomadairement au mois d'octobre 2004 et au mois de juin 2005. Pour ce dernier site, les paramètres immunitaires ont été mesurés après 6 jours en bassin, nourries quotidiennement par T iso et 24 h de confinement en tube, le 7<sup>ème</sup> jour.....</i>	<i>196</i>
<i>Tableau 10 : Mixtures of TBT, atrazine, diuron, and E2. ....</i>	<i>215</i>
<i>Tableau 11 : Panoplie d'outils proposés à utiliser selon l'objectif visé .....</i>	<i>235</i>

## ***Communications scientifiques issues des travaux présentés***

### *Revue à comité de lecture*

- ✍ **M. B. Duchemin**, M. Fournier and M. Auffret (2007). Seasonal patterns of immune parameters of triploid and diploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* **264**: 73-81.
- ✍ M. Auffret, S. Rousseau, I. Boutet, A. Tanguy, A. Mahric, D. Moraga, J. Barron, **M. Duchemin** (2006). A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **63**: 393-405.
- ✍ M. Auffret, **M. Duchemin**, S. Rousseau, I. Boutet, A. Tanguy, A. Mahric, D. Moraga (2004). Monitoring of immunotoxic responses in oysters reared in areas contaminated by the “Erika” oil spill. *Aquatic Living Resources*. **17**(3): 297-302.
- ✍ **M. B. Duchemin**, Michel Auffret, Nathalie Wessel, Marlène Fortier, Yves Morin, Jocelyne Pellerin, Michel Fournier. Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through in vivo, in tubo and in vitro exposures (*soumis à Environmental Pollution*)
- ✍ **M. B. Duchemin**, N. Wessel, M. Fournier, M. Auffret. Flow cytometric measurement of the clearance rate in *Mytilus edulis* and the development of a new individual exposure system for aquatic immunotoxicological studies (*soumis à Environmental Pollution*)

### *Articles en preparation*

- ✍ **M. B. Duchemin**, S. Gauthier-Clerc, M. Auffret, M. Fournier. Assessment of immunotoxic impacts of estuarine anthropogenic activities in *Mytilus edulis* through individual “in tubo” exposure (*in prep.*)
- ✍ **M. B. Duchemin**, Eckerhard Unruh, Sophie Gauthier-Clerc, Philippe Soudant, Christophe Lambert, Miren Cajaraville, Michel Auffret, Michel Fournier. Assessment of phagocytosis in aquatic bivalves: results of recent harmonization studies (*in prep.*)
- ✍ **M. B. Duchemin**, M. Auffret, M. Fournier. Seasonal patterns of immune parameters related to sex and gametogenesis in the blue mussel, *Mytilus edulis* (*in prep.*)
- ✍ Béatrice Gagnaire, **Matthieu Duchemin**, Michel Auffret, Helene Thomas-Guyon and Tristan Renault. Comparison of methods for the evaluation of hemocyte parameters in the

Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, based on flow cytometry (*in prep.*)

### *Rapports d'activités*

- ✍ **Matthieu B. Duchemin** et Michel Auffret. 2005. Diagnostic immunitaire d'huîtres d'élevage provenant de trois sites ostréicoles : Belon, Séné et Carnac. Programme CONCHPOL (financé par RITMER)
- ✍ Michel Auffret, S. Rousseau, I. Boutet, A. Tanguy, D. Moraga, **M. B. Duchemin**. 2004. Recherche d'effets immunotoxiques dans les stocks d'huîtres d'élevage de la zone contaminée par les hydrocarbures de « l'Erika ». Programme « Conséquences écologiques et écotoxicologiques de la marée noire « Erika » ».

### *Présentations orales*

- 🗣 **Matthieu B. Duchemin**, Michel Auffret et Michel Fournier. TBT, atrazine, diuron and 17 $\beta$ -Oestradiol immunotoxic effects on the blue mussel, *Mytilus edulis*, alone and as marine mixtures. SETAC Europe annual meeting – 9 – 14 mai 2006 à La Haye.
- 🗣 **Matthieu Duchemin**. Un océan de REACH... esse ! Forum des doctorants EDSM. Brest. 23 mars 2006
- 🗣 **Matthieu Duchemin**, Michel Fournier et Michel Auffret. Seasonal patterns of immune parameters of the Pacific oysters. 2005. 8<sup>th</sup> International Conference on Shellfish Restoration – 3, 4 et 5 octobre 2005 à Brest
- 🗣 Les moules et les huîtres : brigades des stup de l'environnement marin. 2005. Forum des doctorants EDSM
- 🗣 Principes généraux de l'utilisation du cytomètre. 2005. Cours adressé aux stagiaires de maîtrise du LEMAR
- 🗣 Michel Auffret et **Matthieu Duchemin**. 2005. Relations reproduction – endocrinologie – immunité chez les Mollusques. Colloque IMOPHYS janvier 2005 – Paris.
- 🗣 Application des outils immunotoxicologiques pour l'étude des effets biologiques des contaminants du milieu marin, avancées. 2005. Séminaires LEMAR.
- 🗣 Using flow cytometry to assess immuno-toxicological tools in oysters and mussels. Juin 2004. LEMAR – atelier sur l'utilisation de la cytométrie en flux
- 🗣 Applications des outils immunotoxicologiques pour étudier les effets biologiques des

contaminants du milieu marin. Mars 2004. Forum des doctorants EDSM.

- ☛ GDR IMOPHYS, Volet 3, les perturbations fonctionnelles. January 2004. Journées du LEMAR.
- ☛ Applications des outils immunotoxicologiques pour étudier les effets biologiques des contaminants du milieu marin. Novembre 2003. Séminaire LEMAR.
- ☛ Présentation d'un doctorat en cotutelle. Juin 2003. Séminaire LEMAR.

#### *Posters à des congrès internationaux*

- ☛ Society of Environment, Toxicology and Chemistry, Chapitre St Laurent – 2 & 3 juin 2005: **Matthieu Duchemin**, Michel Fournier and Michel Auffret. “Seasonal patterns of immune parameters of haemocytes of Triploid and Diploid farmed oysters, *Crassostrea gigas*.”
- ☛ Society of Toxicology of Canada – 6, 7<sup>th</sup> of December 2004: **Matthieu B. Duchemin**, Sophie Gauthier-Clerc, Michel Auffret and Michel Fournier. “INDIVIDUAL IMMUNE RESPONSES OF THE BLUE MUSSEL, *Mytilus edulis*, TO ENVIRONMENTALLY RELEVANT CONCENTRATIONS OF TRIBUTYLtin, ATRAZINE, DIURON AND 17 $\beta$  OESTRADIOL”

#### *Activités scientifiques*

- ☛ Comité d'organisation de HARMABIM 2005, harmonizing methods for assessing biomarkers, Quebec, 9<sup>th</sup> – 13<sup>th</sup> May 2005
- ☛ Comité d'organisation de PhagoBIM 2004, harmonizing methods for assessing phagocytosis, Brest, 25<sup>th</sup> – 31<sup>st</sup> March 2004



# *Chapitre 1.*

## *Contexte de l'étude*

---





Toute activité humaine génère des impacts physiques, chimiques ou biologiques sur son environnement. Dans le milieu marin côtier, la présence de contaminants chimiques s'explique par la diversité des polluants liés aux activités anthropiques et par la multiplicité des voies d'exposition de cet écosystème. En effet, premièrement, les activités anthropiques qui s'exercent en zones côtières peuvent, accidentellement ou de manière chronique, perturber le fonctionnement de ces écosystèmes. Deuxièmement, le continuum eau douce – eau de mer véhicule les effluents chargés en polluants des activités anthropiques. Ces activités, en amont des bassins versants de ces zones, génèrent ainsi des impacts chimiques à cette interface que représentent les estuaires. Troisièmement, les particules, ou les aérosols, rejetés dans l'atmosphère par les activités anthropiques peuvent être transportés sur de grandes distances et se dissoudre dans la colonne d'eau à l'interface atmosphère – mer. Enfin, les courants marins, ou les voies de migration ou de dispersion de populations contaminées, agissent également sur les flux de contaminants et en conséquence, sur le niveau d'exposition d'un écosystème donné (OSPAR, 2000; EEA, 2005, 2006). Le milieu marin côtier est ainsi le point de convergence de ces voies d'exposition, soumis à l'impact chimique de nombreuses substances chimiques d'origine exogène, les xénobiotiques.

Une fois ainsi dispersé dans l'environnement, le polluant, ou sa forme transformée dans la colonne d'eau, devient biodisponible. Il peut tout d'abord y rester sous forme dissoute. Il peut également être séquestré dans les sédiments, compartiment qui constitue un véritable réservoir à polluants. Enfin, il peut diffuser à travers les membranes biologiques de tous les organismes unicellulaires et pluricellulaires présents dans la colonne d'eau. Le xénobiotique est alors distribué dans tout l'organisme où il est métabolisé par des organes spécialisés, comme le foie, puis atteint, lui ou sa forme métabolisée, les différents compartiments cibles (Narbonne et Michel, 1997). Selon l'intensité de la dose et de la durée d'exposition, les perturbations chimiques s'exercent à différents niveaux d'organisation : moléculaire, cellulaire, tissulaire, fonctionnelle (Boudou et Ribeyre, 1997). Altérant ainsi la reproduction ou la fonction de défense immunitaire d'une population clef de l'écosystème, les contaminants chimiques peuvent en affecter le fonctionnement durablement. La molécule exogène peut aussi être stockée, et ainsi se bioconcentrer dans l'organisme. L'animal devient alors un vecteur de ce contaminant qui expose, à son tour, son consommateur. Ce consommateur bioconcentre lui aussi ce xénobiotique en fonction de son régime alimentaire et de son exposition directe au polluant. C'est la bioamplification à travers tout le réseau trophique. Les prédateurs en bout de chaîne trophique, les grands prédateurs, sont ainsi

exposés à des concentrations nettement supérieures aux doses initialement présentes dans la colonne d'eau. Tout l'écosystème subit les conséquences toxiques de ces contaminations chimiques multiples, tout comme l'homme qui exploite cette ressource (Gonzalez *et al.*, 2002; Campbell *et al.*, 2005; Lockhart *et al.*, 2005).

Pourtant, depuis le 10 décembre 1982, les états signataires, à Montego Bay, de la « Convention des Nations Unies pour le droit de la mer » ont la responsabilité économique et écologique de leurs zones économiques exclusives (ZEE) – qui s'étend à 200 miles nautiques des côtes territoriales (Partie XII, Section I, Article 192). De plus, avec la mise sur le marché de 1 000 nouvelles substances chimiques, chaque année, les décideurs doivent disposer d'une base rationnelle pour la mise en place de nouvelles réglementations (Formisyn, 2001) telle que la nouvelle réglementation sur les substances chimiques REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) ou, la directive SEVESO II pour le classement des sites industriels en fonction de leur environnement. L'analyse du risque fournit cette base objective, précédant la gestion du risque. L'approche méthodologique d'analyse du risque des substances chimiques comporte généralement trois phases : identification des dangers, évaluation quantitative et qualitative des effets et estimation de l'exposition (Figure 1.1). Le risque environnemental d'un polluant est alors le produit de la probabilité d'occurrence du xénobiotique dans l'environnement, par ses conséquences toxiques dans l'environnement. La caractérisation du risque chimique nécessite des outils permettant la détection, la prédiction et la surveillance des contaminants dans l'environnement (Forbes *et al.*, 2006) mais aussi de leurs métabolites. En effet, certains toxiques, comme les organoétains, sont toxiques sous leur forme originelle et sous leurs différentes formes métabolisées (Bouchard *et al.*, 1999; Hagger *et al.*, 2005).

Ces principes d'analyse du risque chimique peuvent s'appliquer au milieu marin, en respectant, toutefois, les spécificités de ce milieu. Premièrement, dans l'environnement marin côtier, en considérant les différentes voies et sources de contamination, la probabilité de présence d'un toxique potentiellement bioaccumulable (PBT) est proche de 1. D'autre part, dans ce milieu aux conditions physico-chimiques variables, un certain nombre de facteurs environnementaux peuvent moduler la toxicité, la biodisponibilité et la bioaccumulation des substances chimiques dans les différents compartiments de l'écosystème. De plus, de par la diversité des voies d'exposition et des activités anthropiques ayant un impact chimique dans le milieu marin, les contaminants agissent non pas seuls, mais en mélanges dont la toxicité est complexe. Enfin, 84,5 % des données toxicologiques sur les écosystèmes aquatiques

concernent des espèces d'eau douce dont la physiologie diffère de celle des espèces marines ou estuariennes (Marchand et Tissier, 2005).

Originellement développés pour la recherche médicale, les biomarqueurs sont les outils d'analyse du risque chimique. Dans ce domaine, ils sont définis comme des caractéristiques mesurées objectivement et évaluées comme des indicateurs de processus biologiques normaux, de processus pathogènes ou de réponses pharmacologiques à une intervention à but thérapeutique (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Depuis 2001, l'Organisation Mondiale de la Santé, en charge des questions relatives à l'environnement et la santé humaine, définit un biomarqueur comme une substance, une structure ou un processus qui peut être mesuré dans l'organisme, ou ses produits, et qui influence ou prédit l'apparition d'effets ou de maladies (IPCS, 2001). Les biomarqueurs se classent en trois catégories : biomarqueurs d'exposition, d'effet et de sensibilité. Les biomarqueurs d'exposition sont des mesures, dans un compartiment de l'organisme, d'une interaction entre un xénobiotique et une molécule cible. Ils rendent compte alors de l'exposition passée ou présente. Les biomarqueurs d'effet sont des mesures d'une altération biochimique, physiologique, comportementale, ou autre, chez un organisme, provoquée par un effet toxique d'un xénobiotique. Ils rendent compte indirectement d'une exposition passée ou présente, mais renseignent aussi sur les effets de cette exposition. Les outils immunotoxicologiques sont des biomarqueurs d'effets. Les biomarqueurs de sensibilité sont des indicateurs d'une habilité acquise ou inhérente d'un organisme à répondre à une exposition à un xénobiotique spécifique (IPCS, 1993; Lagadic *et al.*, 1997; van der Oost *et al.*, 2003). Dans le domaine de l'écotoxicologie, il est intéressant de considérer l'ensemble de ces définitions de toxicologie environnementale, à quelques nuances près, toutefois. Tout d'abord, les organismes modèles, les bioindicateurs ou sentinelles, doivent être adaptés aux études écotoxicologiques d'un écosystème donné. Par conséquent, les modèles biologiques utilisés en écotoxicologie sont beaucoup plus nombreux que les modèles animaux des études de toxicologie environnementale, par exemple. La mesure d'un biomarqueur doit être développée spécifiquement pour le modèle considéré. D'autre part, les biomarqueurs, individu-centrés, doivent respecter l'équilibre entre détection précoce de la perturbation et pertinence biologique. Par exemple, le développement de nouveaux biomarqueurs, comme les outils moléculaires, qui permettent de détecter de manière très précoce un effet toxique, peuvent aboutir à des conclusions erronées au niveau de l'individu, et plus encore au niveau de l'écosystème (Forbes *et al.*, 2006). Ces outils doivent être étudiés en adéquation avec

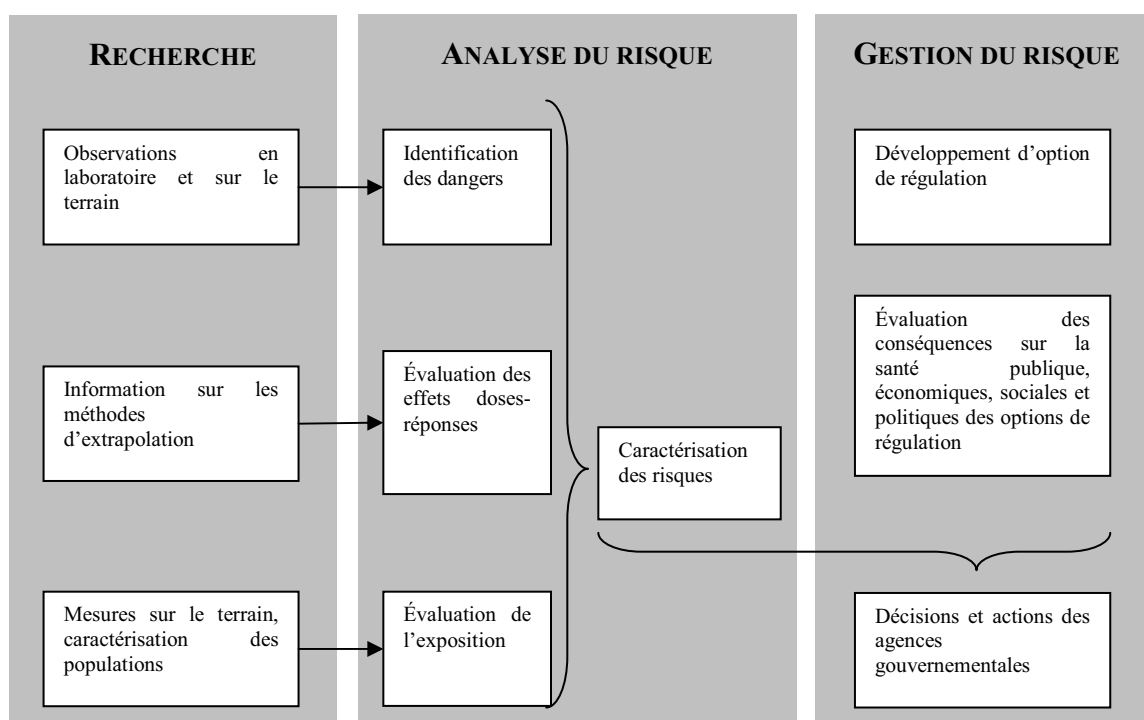


Figure 1.1 : Le paradigme de la recherche, de l'analyse du risque et de la gestion du risque (d'après Formisyn, 2001 (IPCS, 2001))

L'objectif de les utiliser dans l'analyse du risque chimique environnemental. En effet, pour valider un biomarqueur au sens de l'Organisation Mondiale de la Santé, les facteurs intrinsèques (Tableau 1) et les facteurs liés à la mesure de ce biomarqueur (Tableau 2), doivent préalablement être étudiés. C'est dans ce contexte de validation que s'inscrit ce travail.

L'immunotoxicologie étudie les effets toxiques des substances chimiques sur le système immunitaire des animaux et a permis le développement d'outils, depuis ces vingt dernières années, utilisés dans l'évaluation du risque chimique environnemental (Luster *et al.*, 1992; Luster *et al.*, 1993; Krzystyniak *et al.*, 1995) chez les mammifères. Les effets toxiques de nombreuses classes de polluants, sur le système immunitaire des bivalves, écosentinelles des écosystèmes aquatiques, ont déjà été démontrés en laboratoire (Pipe et Coles, 1995; Galloway et Depledge, 2001; Auffret, 2005). Toutefois, plusieurs réponses doivent encore être apportées sur les variations des paramètres immunitaires chez les bivalves. Tout d'abord il est indispensable d'avoir une approche méthodologique permettant de comparer les variations du biomarqueur dans la population avec celles de sa mesure en confrontant les méthodes existantes (Brousseau *et al.*, 2005). D'autre part, le système immunitaire chez les mollusques est bien moins connu que le système immunitaire chez les mammifères et très différent (Cheng, 1981; Fisher, 1986, 1988; Bachere *et al.*, 2004; Little *et al.*, 2005; Ottaviani, 2006). Ce déficit de connaissances écophysiologiques, notamment sur l'impact des facteurs, endogènes comme exogènes (Oliver et Fisher, 1999), pourrait confondre les effets immunotoxiques de xénobiotiques (Selgrade, 1999, 2005), rendant encore plus difficile le lien entre comportement immunitaire et susceptibilité à la maladie (Adamo, 2004). Enfin, les études immunotoxicologiques chez les bivalves doivent tenir compte des réalités chimiques auxquelles ils font face dans leur environnement (Fournier *et al.*, 2005). En résumé, la validation des outils immunotoxicologiques pour l'étude des contaminants chimiques présents dans le milieu marin nécessite d'étudier les facteurs d'impact sur les paramètres immunitaires chez les bivalves (Figure 1.2).

Tableau 1: Facteurs affectant la validité et la faisabilité des études avec des biomarqueurs : procédures analytiques (IPCS, 2001)

- Contraintes d'échantillonnage (de temps, par exemple)
- Nombre de prélèvement pour une précision acceptable
- Degré d'invasivité des procédures de prélèvement
- Disponibilité de méthode de stockage après prélèvement (afin d'éviter une analyse immédiate)
- Contrôler ou réduire la contamination du prélèvement quand il est manipulé en laboratoire
- Simplicité, possibilité d'utilisation en routine, vitesse de réalisation de la procédure
- Véracité, précision et sensibilité
- Spécificité pour le composant d'être détecté : les interférences doivent être identifiées afin d'éviter les erreurs d'interprétation
- Standardisation de la procédure

Tableau 2: Facteurs affectant la validité des biomarqueurs: caractéristiques intrinsèque du biomarqueur (IPCS, 2001)

- Significativité : exposition, effet, sensibilité individuelle
- Spécificité de relation avec le polluant ou la famille de polluant
- Sensibilité : capacité de discriminer des populations statistiques avec des niveaux d'exposition différents, susceptibilité ou degré d'effet
- Connaissance de base de ce biomarqueur dans la population générale
- Existence de courbes doses-réponses entre le niveau d'exposition et l'intensité de la réponse du biomarqueur
- Estimation des variabilités inter et intra individuelle
- Connaissance sur les facteurs confondants qui peuvent affecter le biomarqueur

Ainsi, après avoir fait une revue de littérature sur cette problématique, le développement méthodologique, présenté dans le chapitre 3, s'attachera à comparer des méthodes d'analyse du système immunitaire ou d'exposition adaptées à l'étude de paramètres individuels. La quatrième partie étudiera précisément l'impact du sexe, du cycle reproducteur et des paramètres environnementaux sur les variations du système immunitaire chez l'huître creuse et la moule bleue. Enfin, la cinquième partie sera consacrée à l'application des connaissances acquises dans les parties précédentes pour l'étude du risque chimique, à des doses environnementales, d'activités anthropiques agissant sur le milieu marin. L'avant dernière partie discutera de l'ensemble des résultats obtenus et les restituera dans le cadre de l'utilisation des outils immunotoxicologiques pour l'évaluation du risque chimique en milieu marin. Enfin, cette étude se terminera sur une conclusion générale et des perspectives de recherche et de valorisation des résultats.



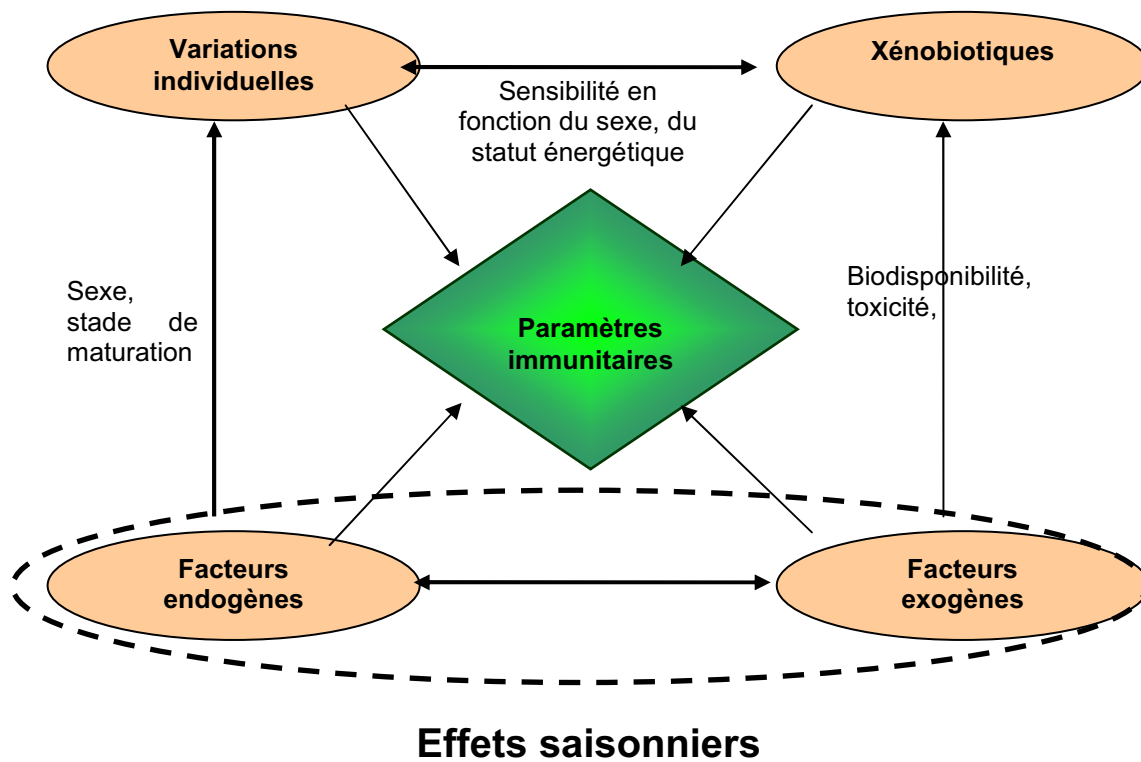


Figure 1.2: Schéma conceptuel des facteurs d'impact sur les paramètres immunitaires.

# Chapitre 2.

## Revue de littérature

---

<b>I. PRESENTATION DU CHAPITRE</b>	<b>35</b>
<b>II. LES XENOBIOTIQUES PRESENTS DANS LE MILIEU MARIN</b>	<b>36</b>
A. LES INSTRUMENTS LEGISLATIFS RELATIFS A LA PRESENCE DE SUBSTANCES CHIMIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN	36
B. LES BIOCIDES DANS LE TRANSPORT MARITIME	40
C. LES PESTICIDES A USAGE AGRICOLE	41
D. LES REJETS INDUSTRIELS	44
E. LES PRODUITS PHARMACEUTIQUES, COSMETIQUES ET VETERINAIRES	48
<b>III. LES MODELES BIOLOGIQUES ETUDIES</b>	<b>50</b>
A. LES BIVALVES, ECOSENTINELLES DU MILIEU MARIN	50
B. L'AQUACULTURE, UN OUTIL NECESSAIRE DE PRODUCTION DE MODELES BIOLOGIQUES	51
C. L'HUITRE CREUSE, <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> (THUNBERG, 1793)	53
D. LA MOULE, <i>MYTILUS EDULIS</i> (LINNE, 1758) ET <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i> (LAMARCK, 1819)	55
E. DES ORGANISMES SOUMIS AUX MALADIES	57
<b>IV. LES HEMOCYTES, CELLULES CIRCULANTES ET PLURIPOTENTES CHEZ LES BIVALVES</b>	<b>59</b>
A. LES DIFFERENTS TYPES D'HEMOCYTES	59
B. LES FONCTIONS DES HEMOCYTES	60
C. LE CENTRE HEMATOPOÏETIQUE CHEZ LES MOLLUSQUES	62
<b>V. LE SYSTEME IMMUNITAIRE DES BIVALVES</b>	<b>63</b>
A. MECANISMES CELLULAIRES DU SYSTEME IMMUNITAIRE	63
B. PEPTIDES ANTIMICROBIENS ET AUTRES FACTEURS HUMORAUX	64
C. LES REPONSES ANTICIPEES DU SYSTEME IMMUNITAIRE CHEZ LES INVERTEBRES	65
<b>VI. IMMUNOTOXICOLOGIE ET SANTE DE L'ENVIRONNEMENT</b>	<b>67</b>
A. L'IMMUNOTOXICOLOGIE	67
B. LES MECANISMES IMMUNOTOXIQUES DES PESTICIDES	68
C. LES MECANISMES IMMUNOTOXIQUES DES METAUX LOURDS	70
D. IMMUNOTOXICITE D'AUTRES IMPACTS ANTHROPIQUES	70
E. CONSEQUENCES IMMUNOTOXIQUES DE LA CONSOMMATION D'ALIMENTS CONTAMINES	71
F. IMMUNOTOXICITE ET FACTEURS ENDOGENES	72
G. L'EVALUATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE	72
H. L'ANALYSE DES PARAMETRES IMMUNITAIRES : INTERET DE LA CYTOMETRIE EN FLUX	73



## **I.    *Présentation du chapitre***

Ce chapitre présente une revue de littérature permettant une vue large et concise de la problématique liée à la validation des outils immunotoxicologiques pour l'étude d'effets biologiques des contaminants présents dans le milieu marin. Ces travaux de thèse se sont voulus applicatifs et répondant au besoin sociétale de gestion des substances chimiques dans le milieu marin. C'est pourquoi la partie suivant, dédiée à différents groupes de polluants en présentant l'origine de leur occurrence dans le milieu marin, quelques effets biologiques notoires et une courte synthèse de l'aspect réglementaire liée à ces substances, débute par une comparaison des politiques de gestion des substances dangereuses dans la France, l'Union Européenne et la Canada, les autorités réglementaires dans lesquels s'inscrit cette thèse. La troisième partie de ce chapitre présente les modèles biologiques étudiés, leurs caractéristiques biologiques, mais aussi économiques de part et d'autre de l'Atlantique. La quatrième partie traite des cellules analysées en immunotoxicologie des bivalves, les hémocytes. Le fonctionnement général du système immunitaire chez les bivalves sera présenté dans la cinquième partie. La partie suivante fait une revue des connaissances des effets immunotoxicologiques des polluants acquises au cours des vingt dernières années en terminant sur la description du principe analytique utilisé par après dans ces travaux.

## **II. Les xénobiotiques présents dans le milieu marin**

### **A. Les instruments législatifs relatifs à la présence de substances chimiques dans l'environnement marin**

Devant l'occurrence des substances chimiques dans l'environnement, les scientifiques, lors d'études d'évaluation du risque pour la santé humaine et pour l'environnement ont déterminé que le caractère persistant, bioaccumulable et toxique des substances chimiques est un sujet de préoccupation sociale et environnementale lors de contaminations chroniques. Les décideurs ont, en conséquence, imaginé différents instruments réglementaires, internationaux ou nationaux, concernant la mise sur le marché de nouvelles substances chimiques ou la protection de l'environnement. Ainsi, la convention internationale de Stockholm (2001) traite des polluants organiques persistants (POP). De même, des outils législatifs ont vu le jour ces vers la fin du 20<sup>ème</sup> siècle pour préserver les écosystèmes marins. La convention internationale de Montego Bay (1982), en donnant naissance aux zones économiques exclusives (ZEE) impose la responsabilité économique, mais aussi écologique, de ces zones marines. Avec une zone économique exclusive respectivement de 11 000 000 km<sup>2</sup> et de 5 000 000 km<sup>2</sup>, la France, 2<sup>ème</sup> au rang mondial et le Canada, 5<sup>ème</sup> au rang mondial, sont donc des acteurs majeurs de la protection des écosystèmes marins côtiers. Cette responsabilité écologique peut s'agrémenter d'objectifs de qualité de l'eau. Ainsi, la loi bilatérale, entre le Canada et les Etats-Unis, de l'assainissement de l'eau, depuis 1985, s'est fixée des objectifs d'éliminations de polluants. En Europe, la directive-cadre eau, adoptée en 2000 par les états membres et, impose le « bon état écologique », notamment au regard des polluants, de tous les écosystèmes aquatiques d'ici 2015. La loi sur l'eau, votée au 31 décembre 2006, est la transcription nationale de cette directive-cadre et offre aux collectivités locales des outils pour atteindre ces objectifs. Néanmoins, à part les directives de l'Organisation Maritime Internationale relatives aux conditions de transport des substances dangereuses, par voie maritime (annexes II et III de la convention MARPOL 73/78), ou la création de commissions intergouvernementales pour la protection de l'environnement marin des grands bassins européens (Méditerranée, Atlantique Nord-Est, Mer Baltique), les risques de contamination chronique par des substances chimiques jugées préoccupantes dans les milieux marins ou estuariens, demeurent sous-évalués (Marchand et Tissier, 2005).

En matière de gestion des substances chimiques dangereuses pour l'environnement ou

pour la santé humaine, en 1999, le Canada a adopté une loi, la loi canadienne pour la protection de l'environnement (LCPE). La France a inscrit en 2005 le principe de précaution en matière d'environnement dans sa constitution (charte pour l'environnement, article 5, constitution de la cinquième république française, 2005) et applique le technical guidance document (TGD) européen en support à la législation. Ces instruments réglementaires établissent des critères de sélection des substances chimiques préoccupantes, en fonction de leurs caractéristiques de persistance, de bioaccumulation et de toxicité (Tableau 3). Le critère de persistance d'une substance, caractérisée par son temps de demi-vie dans un compartiment de l'environnement (air, eau, sol), est plus drastique dans le TGD que dans la LCPE, et instaure une discrimination entre le compartiment eau de mer et eau douce. La bioaccumulation d'un produit est caractérisée par sa capacité à se concentrer dans les tissus des organismes (bioconcentration) ou à se bioamplifier le long de la chaîne trophique (bioamplification), selon son coefficient de partage octanol-eau. Ce critère de sélection diffère entre les deux outils, la LCPE définissant une limite inférieure de bioaccumulation identique aux substances très persistantes et très bioaccumulables (vPvB) du TGD. En matière de critère de toxicité, ces outils divergent également. Alors que le TGD reconnaît les effets cancérogènes, mutagènes, toxiques pour la reproduction (CMR) et les perturbateurs endocriniens, la LCPE reconnaît, plus généralement, les effets graves et irréversibles pour l'homme ou l'environnement.

Il en résulte des listes pouvant être différentes, mais aussi une gestion différente des substances jugées préoccupantes. Le Canada prévoit deux traitements différents pour les substances qui répondent à tous les critères de sélections (substances de la voie 1) et celles qui répondent seulement à un ou deux critères (substances de la voie 2). Les substances de la voie 1 doivent alors être virtuellement éliminées alors que celle de la voie 2 doivent faire l'objet d'une gestion intégrale de manière à minimiser leur impact sur l'environnement et sur l'homme (Environnement Canada, 2004). La dose minimale acceptée dans ce système de gestion, est la concentration la plus faible pouvant être mesurée par des méthodes analytiques courantes mais précises. En Europe, le seuil de risque acceptable, au-delà duquel des mesures sont prises, est défini par le rapport entre la concentration prévisible dans l'environnement (PEC) et la concentration prévisible sans effets toxiques (PNEC).

Cette analyse comparée des outils législatifs canadiens et européens pour la gestion des substances chimiques met en lumière, surtout, une approche conceptuelle différente. Le Canada a une approche très préventive et se focalise sur les effets des substances, alors qu'en

Europe, l'accent est plutôt mis sur l'évaluation de l'exposition pour caractériser le risque. La loi canadienne pour la protection de l'environnement (LCPE) permet également la mise en place de différentes réponses législatives pour la prévention, la lutte antipollution ou l'assainissement de l'environnement. Ce sont des règlements, des plans de prévention de la pollution, des plans en cas d'urgence environnementale, des codes de bonne pratique environnementale et des lignes directrices concernant les rejets dans l'environnement (Environnement Canada, 2004). En France, les préfets des zones maritimes (Atlantique, Manche et Méditerranée) ont, depuis 2006, la responsabilité de la protection de l'environnement marin dans le cadre de l'action de l'état en mer (AEM), et le centre de documentation de recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux (CEDRE) est spécialisé dans la lutte antipollution en milieu marin. L'agence européenne de sécurité maritime (EMSA) est en charge de cette problématique au niveau européen. Enfin, une nouvelle réglementation européenne a récemment été adoptée afin d'évaluer le risque à l'homme et à l'environnement, d'enregistrer et d'autoriser la mise sur le marché de toutes les substances chimiques produites, importées ou exportées en Europe au-delà de 1 000 tonnes par an (REACH) transférant la responsabilité de l'évaluation des risques vers les industriels. L'état devient alors le garant de l'intégrité de l'environnement sous sa responsabilité auprès de ces concitoyens.

Tableau 3 : Critères de sélection des caractéristiques des substances chimiques en vigueur en Europe, selon le Technical Guidance Document (TGD) et au Canada, selon la Loi Canadienne de Protection de l'Environnement (LCPE) (Environnement Canada, 2004; Marchand et Tissier, 2005).

	<b>Europe (TGD)</b>		<b>Canada (LCPE)</b>
<b>Persistence (P)</b>	<b>Substances PBT</b>	<b>Substances vPvB</b>	
▪ eau de mer	Demi-vie > 60 j	} Demi-vie > 60 j	Demi-vie > 182 j
▪ eau douce	Demi-vie > 40 j		
▪ sédiments d'eau de mer	Demi-vie > 180 j	} Demi-vie > 180 j	Demi-vie > 365 j
▪ sédiments d'eau douce	Demi-vie > 120 j		
<b>Bioaccumulation (B)</b>	FBC > 2 000 ou Log K <sub>oe</sub> > 4,5	FBC > 5 000	FBA ≥ 5 000 ou FBC ≥ 5 000 ou Log K <sub>oe</sub> ≥ 5,0
<b>Toxicité (T)</b>	NOEC (No Observed Effect Concentration) < 0,01 mg.L <sup>-1</sup> Substances CMR (Cancérogènes, mutagènes ou ayant des effets sur la reproduction) ou effets perturbateurs endocriniens		Toxique selon la LCPE ou équivalente toxique selon la LCPE
<b>Principalement anthropique</b>	-		Présence dans l'environnement largement due à une activité humaine



## **B. Les biocides dans le transport maritime**

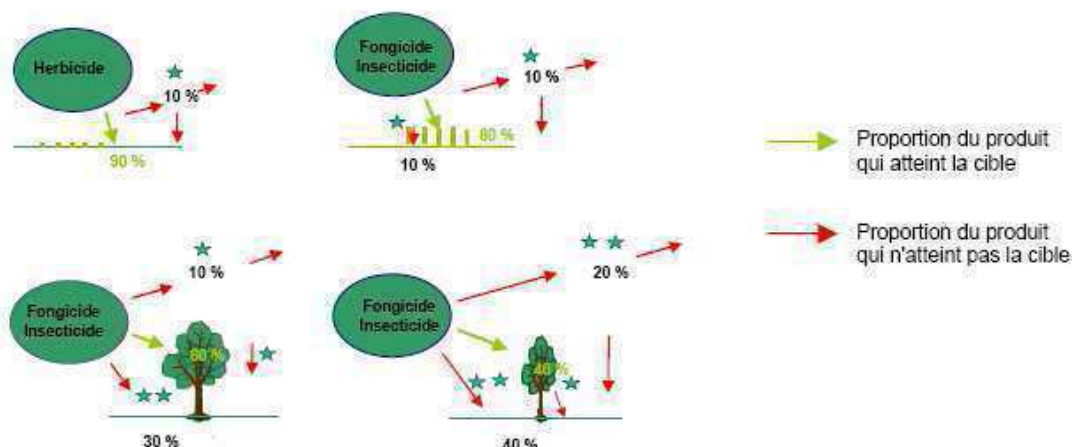
Les biocides sont utilisés par l'homme pour lutter contre des espèces jugées nuisibles. Ils sont un ensemble de molécules très diverses et sont classés comme des pesticides à usage non agricole (MEDD, 2006). Ils regroupent les désinfectants ménagers, les insecticides, les produits de traitement du bois, des eaux et des peintures anti-salissures, etc. Leur mise sur le marché est réglementée en Europe (directive communautaire 98/8/CE). Leur occurrence dans le milieu marin est liée au trafic maritime. En effet, l'industrie du transport maritime qui couvre 75% du transport de fret en Europe (EEA, 2006) utilise ces biocides dans les peintures anti-salissures de coques afin d'empêcher la prolifération d'organismes marins sur les coques des navires. Mais par diffusion ou érosion ces biocides agissent aussi contre de nombreux autres organismes végétaux ou animaux de l'écosystème marin côtier. Parmi ces biocides figure le tributyl étain (TBT) également utilisé dans l'industrie pétrochimique comme catalyseur. Le TBT est un puissant perturbateur endocrinien induisant des défauts de biocalcification de la coquille chez *Crassostrea gigas* (Alzieu *et al.*, 1980), des retards de gamétogenèse chez *Mya arenaria* (Siah *et al.*, 2003), l'apparition chez les femelles exposées d'un imposex chez *Nucella lapidius* (Huet *et al.*, 1996), et encore d'autres perturbations de croissance, de reproduction et de système immunitaire chez les mollusques marins d'intérêt écologique et économique (Bouchard *et al.*, 1999; Alzieu, 2000; Cima et Ballarin, 2004). Dès 1982, la France interdit l'utilisation de peinture anti-salissures contenant du TBT sur les coques de navire de moins de 25 m. En 1990, l'Organisation Maritime Internationale adopta une résolution demandant aux différents gouvernements de reprendre cette disposition. La Commission européenne émit une directive en 1992 en ce sens. En 2003, l'OMI et la Commission européenne étendirent ces réglementations à tous les navires, excepté les navires étatiques, pour une interdiction totale en 2008. A ce jour, la France n'a pas ratifié ces dernières réglementations.

### C. Les pesticides à usage agricole

La préoccupation environnementale de ces biocides à usage agricole s'est accrue ces trente dernières années avec l'agriculture intensive. Leur caractère neurotoxique et cancérigène chez l'homme et leur présence dans l'environnement nécessite une évaluation des risques induits. En effet, lors des épandages de pesticides dans les champs, les pertes dans l'air, dans le sol, puis dans les eaux de surface peuvent être supérieures à 60 %, selon le type de pesticides, le mode d'épandage et les conditions météorologiques (Savini, 2005). Mais, après les épandages, les pesticides peuvent continuer de se disperser dans l'environnement et contaminer *in fine* le milieu marin (Figure 2.3). Malgré les réglementations en vigueur de part et d'autre de l'Atlantique, l'évaluation de leur toxicité est très hétérogène, et bien que peu d'études toxicologiques aient été publiées chez les organismes marins, le caractère persistant de ces substances et leur immunotoxicité ont été démontrée chez de nombreux organismes modèles d'autres écosystèmes (Voccia *et al.*, 1999). Ces études doivent inciter les gestionnaires à la vigilance quant au risque environnemental de ces molécules en milieu marin. Ainsi, plus de huit groupes de pesticides ont été mesurés à des doses significatives dans les eaux et les tissus des organismes de la zone arctique (WWF, 2005). Sans compter les zones agricoles des bassins versants, les surfaces agricoles dans les zones côtières européennes ont eu tendance à diminuer (EEA, 2005). Néanmoins, la France occupe la 3<sup>ème</sup> place mondiale et la 1<sup>ère</sup> européenne pour la consommation de pesticides (Savini, 2005) alors que les pratiques phytosanitaires sont mal évaluées et ont peu évolué, en diminuant seulement de 20% l'utilisation des pesticides (Figure 2.4). Le Canada, au contraire, a adopté en 2003 un code de bonnes pratiques des pesticides.

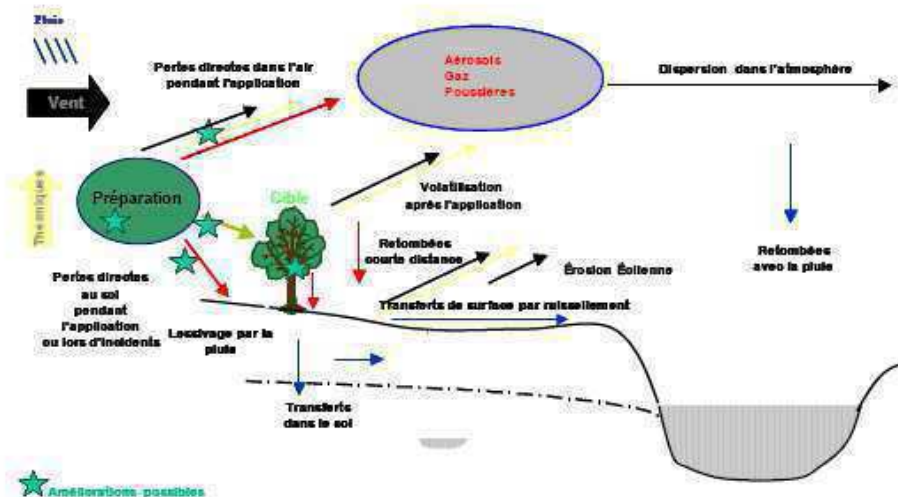
## La dispersion des pesticides dans l'environnement

### . Pertes lors de l'application



Lors de l'application, les pertes en direction des différents compartiments de l'environnement varient suivant l'état de développement des cultures, le réglage du pulvérisateur, la composition de la bouillie pulvérisée et les conditions météorologiques (les valeurs mentionnées dans la figure ci-dessus ne sont qu'indicatives). Les possibilités d'amélioration sont multiples, mais elles seront toujours difficiles à mettre en œuvre car leur résultat ne sera jamais facile à visualiser. Compte tenu de la géométrie de la végétation, et des difficultés de traitement qui en résultent, les gains seront plus importants en cultures pérennes qu'en cultures annuelles basses.

### . Voies et mécanismes de dispersion dans l'environnement



Les mécanismes de dispersion sont très nombreux et dépendent principalement du couvert végétal, des caractéristiques du sol, du fonctionnement hydrologique, et donc des substrats géologiques et des conditions climatiques pendant et après l'application, et de la composition des produits épandus. Alors qu'ils peuvent jouer un rôle important, les mécanismes de volatilisation sont encore peu connus car difficiles à mesurer. Ainsi, compte tenu de la grande variabilité des mesures de terrain, les approches par modélisation s'avèrent nécessaires pour quantifier correctement les niveaux d'exposition des différents compartiments de l'environnement.

Figure 2.1: Schémas des pertes de pesticides dans l'environnement pendant les épandages et des voies et mécanismes de dispersion des pesticides dans les écosystèmes aquatiques (Savini, 2005).



Figure 2.2 : Evolution des tonnages de substances actives vendues en France entre 1990 et 2004 (Source UIPP, "Les chiffres clés" 2004 in Savini, 2005)

## **D. Les rejets industriels**

Conceptuellement, les industries produisent des biens à partir de matières premières transformées par des process industriels, à l'aide de compétences humaines. Le risque chimique pour le fonctionnement des écosystèmes et la santé humaine est lié aux conditions de transport, de stockage et de manipulation de ces entrées et sorties. La nature des substances chimiques utilisées dans ces processus industriels étant très variée – 100 000 molécules différentes sont actuellement sur le marché européen – leur évaluation du risque pour l'environnement et la santé humaine est difficile. De par leur accès à la mer, les zones côtières sont le siège de nombreuses industries très diverses (Figure 2.3) rejetant un nombre de polluants persistants, bioaccumulables et toxiques aussi variés, réglementés par la convention de Stockholm de 2001. Cette convention a induit une réduction des rejets de ces polluants organiques dans l'environnement. Notamment les hydrocarbures rejetés par l'industrie pétrolière, acteur majeur des activités anthropiques en milieu marin, ont baissé de 60% au cours des vingt dernières années, dans l'Atlantique Nord-Est, zone de compétence de la commission OSPAR (Figure 2.4).

Ces rejets industriels peuvent avoir des effets sur la qualité de la ressource exploitée par l'homme et sur la santé humaine. Ainsi, le mercure, rejeté par un certain nombre d'industries (métallurgie, industrie plastique, incinération de déchets, mines, etc.), devient persistant et bioaccumulable une fois transformé en méthylmercure dans la colonne d'eau. Ce métal lourd, ou toxique, bloque des sites actifs vitaux dans les organismes et induit des effets neurotoxiques et immunotoxiques, en se combinant aux atomes de soufre (IPCS, 1976, 1991; Moszczynski, 1997; Lockhart *et al.*, 2005). Dans les années cinquante, la population de la Baie de Minamata, au Japon, a développé, de manière anormalement élevée, diverses neuropathologies graves liées à la consommation de poissons exposés au mercure rejetés par les industries locales. Le problème global du mercure a récemment été reconnu et fait l'objet (Stratégie communautaire sur le mercure, 2005) et d'une directive du Programme des Nations Unis pour l'Environnement. Enfin, les rejets peuvent être transportés au-delà des frontières politiques et exporter ainsi leurs conséquences toxiques. Par exemple, à l'instar des pesticides, les polychlorobiphényles (PCB) utilisés dans l'industrie électrique et hydraulique, persistants et bioaccumulables, sont transportés par les courants marins et aériens jusque dans les zones polaires, et sont observés dans le lait maternel des populations arctiques (Figure 2.5).

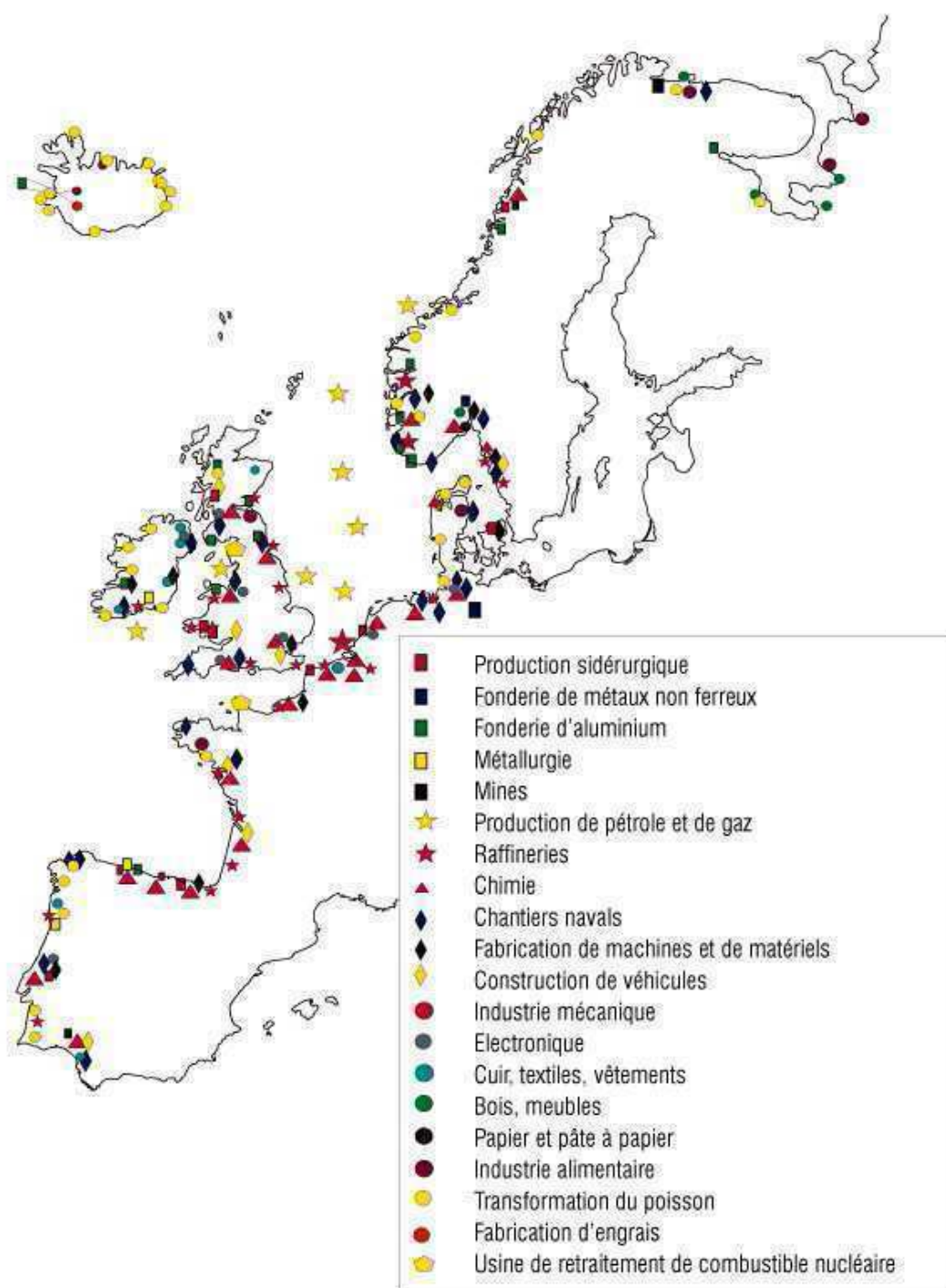


Figure 2.3 : Diversité des activités industrielles dans les zones côtières de l'Europe de l'Ouest  
(source : Bilan de santé OSPAR, 2000)

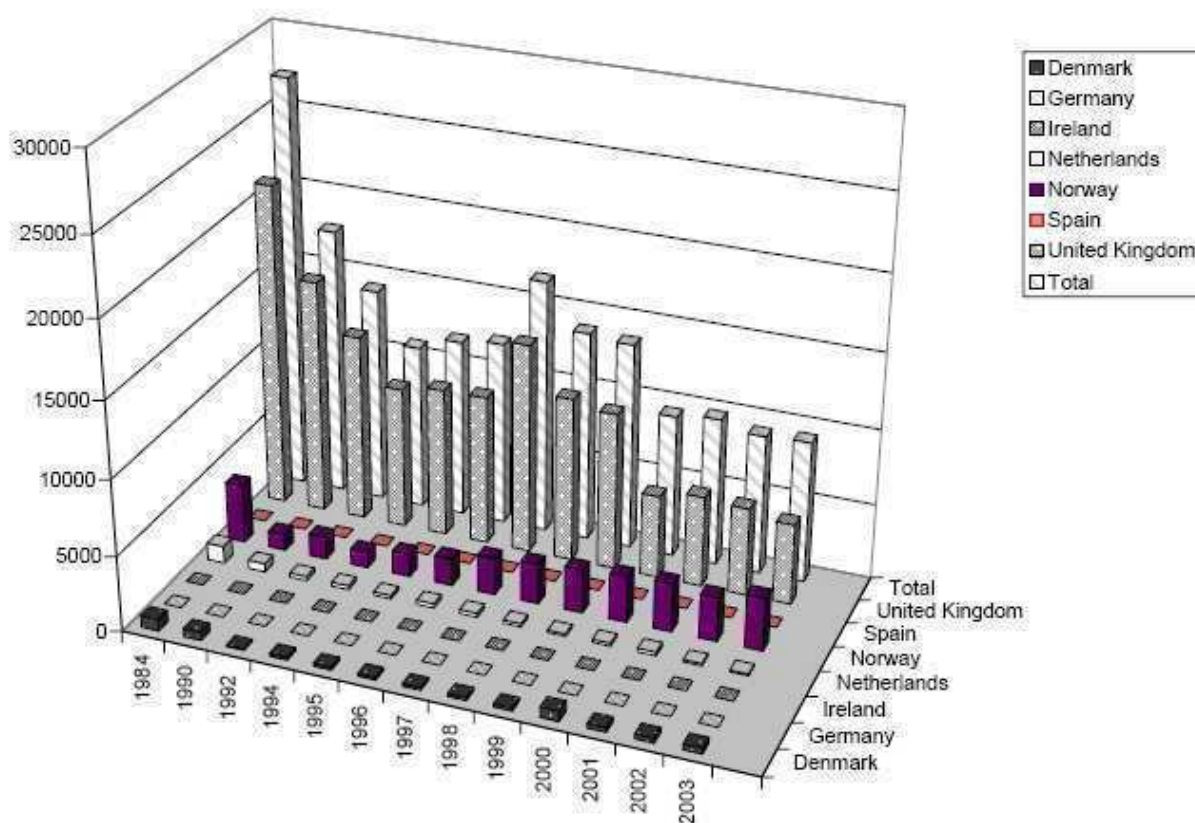


Figure 2.4 : Rejets totaux, en tonnes, d'hydrocarbures liés à l'industrie pétrolière, par pays entre 1984 et 2003. D'après (OSPAR, 2006)



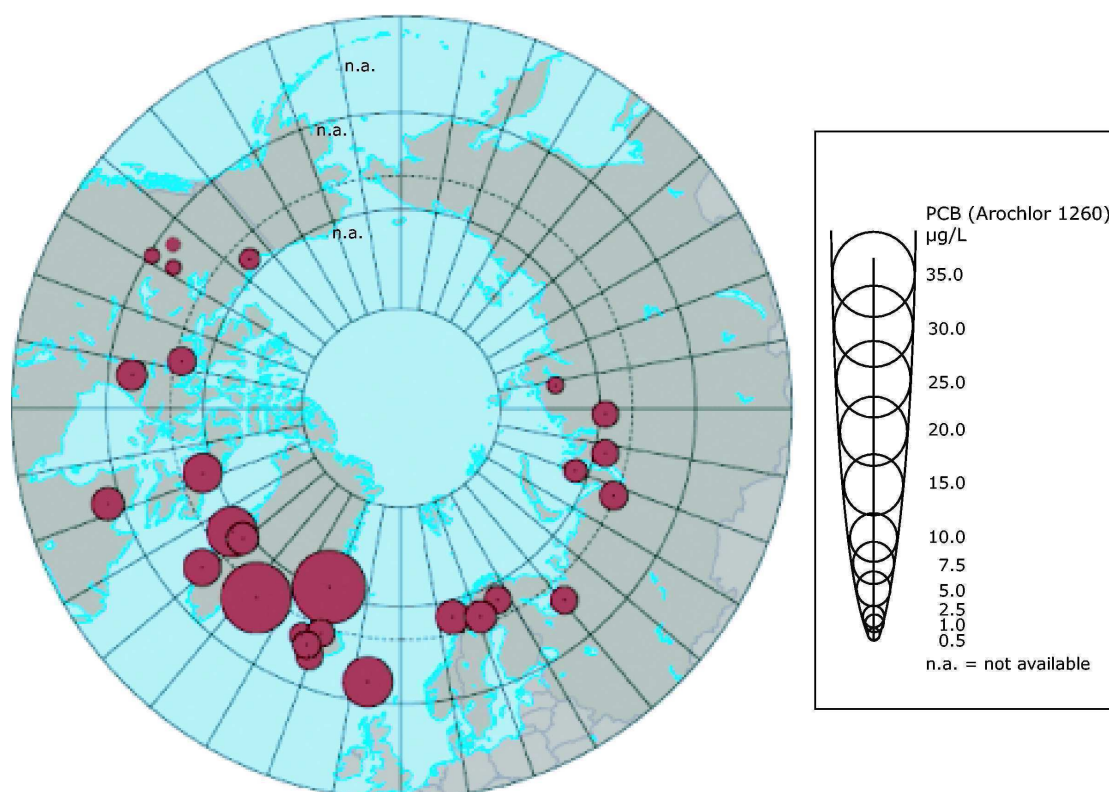


Figure 2.5 : Distribution des PCB en zone arctique (Agence Environnementale Européenne 2005)



## **E. Les produits pharmaceutiques, cosmétiques et vétérinaires**

Avec le développement de l'écotoxicologie, de nouvelles molécules attirent récemment l'intérêt des scientifiques et des gestionnaires. Parmi elles, les produits pharmaceutiques, cosmétiques et vétérinaires font, depuis quelques années, l'objet d'une attention particulière dans les pays développés. Bien que leur mise sur le marché soit autorisée par des agences gouvernementales pour leurs effets thérapeutiques, sur la base, entre autres, d'études toxicologiques, une fois métabolisées et excrétées, le risque environnemental ou sanitaire de ces molécules est bien moins caractérisé (Daughton et Ternes, 1999). Néanmoins, leur présence dans l'environnement, notamment dans les eaux usées urbaines, préoccupent les scientifiques au Canada (Lishman *et al.*, 2006), en Chine (Ma *et al.*) et dans d'autres régions urbaines (Ellis, 2006). L'inefficacité des procédés actuellement utilisés dans les usines de traitement des eaux usées urbaines contribue à la dispersion de ces substances dans les écosystèmes aquatiques dont les effets toxiques restent peu évalués. A titre d'exemple, 85% des eaux usées des grandes villes du pourtour méditerranéen ne sont pas traitées (PNUE, 2006). De plus, quand ces produits sont traités, leur biodisponibilité et leur toxicité, après transformation, est inconnue (Gagnon, 2005). De par leur variété de groupes chimiques, leur analyse est complexe. Pourtant des expositions à des effluents urbains ont déjà induits des effets toxiques chez les bivalves ou les poissons, comme des perturbations endocriniennes (Gagne *et al.*, 2004; Quinn *et al.*, 2004), des perturbations de l'activité mitochondriale (Gagne *et al.*, 2006a) ou du système immunitaire (Hoeger *et al.*, 2004; Gagne *et al.*, 2006b). Ces effets témoignent d'un risque réel d'exposition chronique pour l'homme et l'environnement. Les principes actifs de ces molécules sont très divers (Tableau 4) et persistent une fois en contact avec d'autres organismes vivants. La présence de ces contaminants est donc liée aux mœurs et tailles des populations des zones côtières. Même si les infrastructures liées au tourisme n'induisent que peu d'impact sur l'environnement marin côtier en Europe de l'Ouest (OSPAR, 2006), les flux de populations saisonniers, induits par cette activité, contribuent à perturber l'écosystème marin des pays consommateurs de ces produits.

Tableau 4: Principaux produits pharmaceutiques, cosmétiques et vétérinaires mesurés dans les effluents urbains et leur utilisation (d'après Ellis, 2006)

<i><b>Groupe ou classe de composés</b></i>	<i><b>Composés</b></i>
<i>Médicaments</i>	
Antibiotiques à usage vétérinaire et humain	Triméthoprim, Erytromycine, Lincomicine, Sulfaméthoxazole, Chloramphenicol, Amoxicilline
Substances antalgiques et anti-inflammatoires	Ibuprofène, Diclofénac, Fénoprofène, Naproxène, acide acétylsalicylique, Fluoxétine, kétoprofène, Indométacine, paracétamol
Substances psychotropes	Diazépam, carbamazépine
Hypolipémiant	Bezafibrate, Fenofibrate, Etofibrate, gemfibrozil,
$\beta$ -bloquants	Métoprolol, Propranolol, Timolol, Sotalol, atenolol,
Produits de contraste	Iopromide, Iopamidol, diatrizoate
Hormones stéroïdiennes	Oestradiol, Oestrone, Oestriol, diethylstilbestrol (DES)
<i>Produits d'hygiène corporelle</i>	
Parfums	Nitro, dérivés polycycliques et macrocycliques, phthalates
Filtres solaires	Benzophénone, méthylbenzylidene
Répulsifs	N,N-diethyltoluamide
<i>Antiseptiques</i>	Triclosan, chlorhexidine

### **III. Les modèles biologiques étudiés**

#### **A. Les Bivalves, écosentinelles du milieu marin**

Les Bivalves appartiennent à l'embranchement des Mollusques. Suspensivores, les Bivalves doivent filtrer la colonne d'eau pour s'alimenter en phytoplancton et en matière organique en suspension. Consommateurs primaires et secondaires, ils peuvent être consommés par des prédateurs, ce sont des espèces clefs dans l'équilibre de l'écosystème (Gosling, 2003). Ils peuvent filtrer jusqu'à  $3\text{L.h}^{-1}$  pour la moule (Riisgard *et al.*, 2003), étant en contact quasi permanent avec les aléas physico-chimiques naturels (température, salinité, hydrodynamisme, etc.) de la colonne d'eau et de contaminants dissous ou adsorbés à la surface des particules alimentaires. Ils accumulent ainsi ces contaminants, ou les particules alimentaires chargées en contaminants, dans leurs tissus en même temps qu'ils en subissent les effets toxiques (Frazier, 1979; Widdows et Donkin, 1991; Meng *et al.*, 2005; Magnusson *et al.*, 2006). Majoritairement sessiles et tous sédentaires, les Bivalves ne peuvent échapper à une zone contaminée. Pêchés ou cultivés pour la consommation humaine, ils peuvent ainsi exposer l'homme à ses xénobiotiques. Enfin, toutes ces caractéristiques écologiques des Bivalves, ajoutées à leur large répartition géographique de populations naturelles ou en culture en font des espèces de choix pour la recherche et l'étude des biomarqueurs les mieux adaptés aux préoccupations environnementales spécifiques du milieu marin. Ces espèces sont alors qualifiées d'espèces « sentinelles ». En ce sens, l'aquaculture permet de fournir aux scientifiques des groupes homogènes d'animaux, par rapport à la pêche ou la collecte d'individus sauvages (IPCS, 1996), de même que de développer des techniques et des connaissances zootechniques afin d'améliorer les conditions opératoires de l'expérimentation.

## **B. L'aquaculture, un outil nécessaire de production de modèles biologiques**

La conchyliculture n'a eu de cesse d'augmenter ces vingt dernières années, les moules et les huîtres étant les principales espèces produites à travers le monde (FAO, 2003). En Europe, la production a atteint, en 2004, 764 308 tonnes de Mollusques dont 78% de moules (*Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis* et autres mytilidés) et 17% d'huîtres (*Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis* et autres ostréidés). Au début des années 80, la production conchylicole canadienne était surtout soutenue par la production de *Crassostrea gigas*. À partir de 1983, la production de moules a débuté. En 2004, le Canada produisait 37 925 tonnes de coquillage dont 60 % de moules (*Mytilus edulis* et *Mytilus trossulus*) et 33,3 % d'huîtres (*Crassostrea gigas* et *Crassostrea virginica*). Enfin, en France, la production conchylicole est d'abord portée par l'ostréiculture avec 115 250 tonnes produites en 2004 (Figure 2.6).

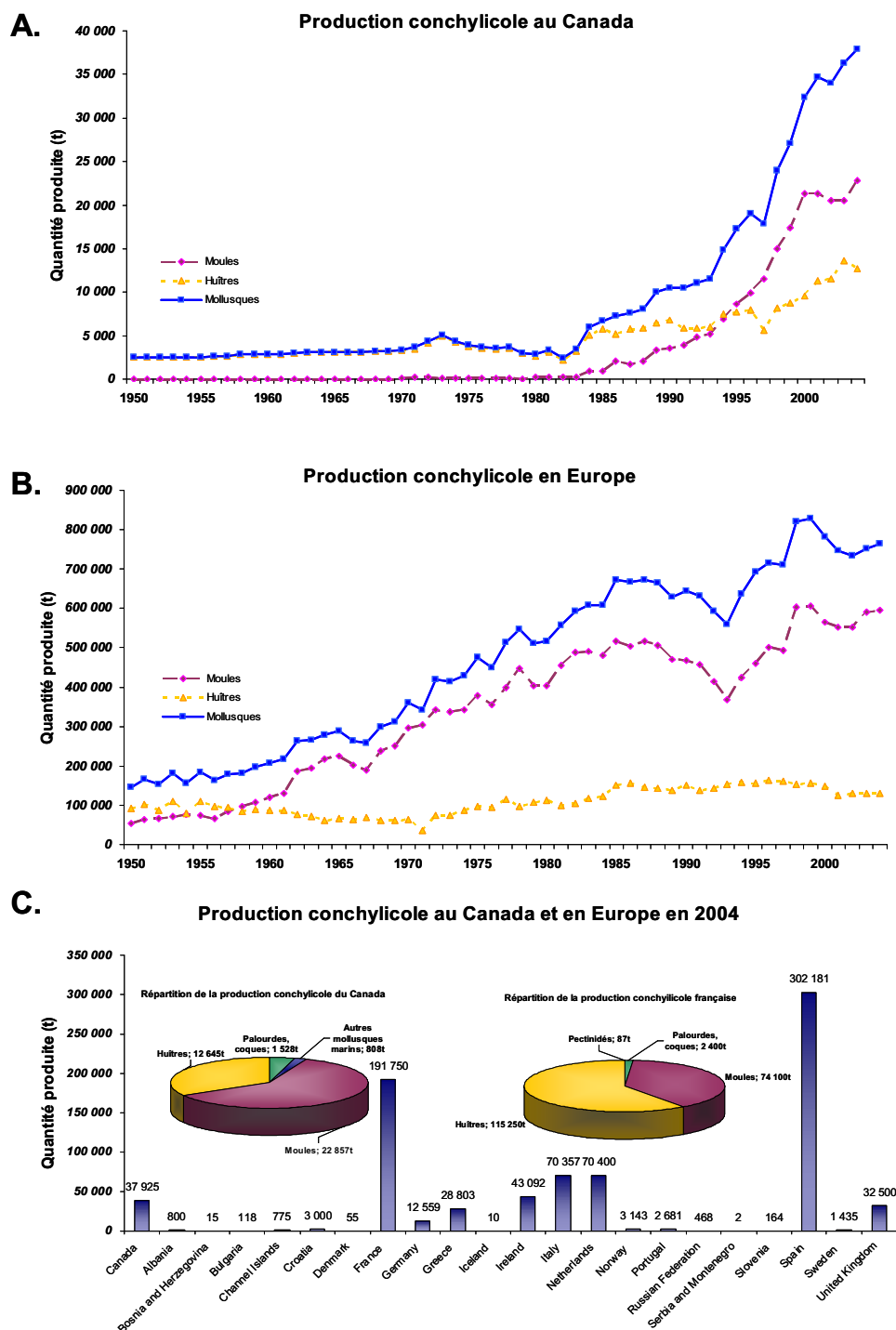


Figure 2.6: Production conchylicole au Canada et en Europe. Historique de la production totale de Mollusques, d'huîtres et de moules au Canada (A.) et en Europe (B.). Production conchylicole en 2004 au Canada et dans les pays européens et répartition par espèces produites en France et au Canada (C.). D'après les données brutes du Fisheries Global Information System (FIGIS, 2006).

### C. L'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)

L'huître du Pacifique ou huître creuse, *Crassostrea gigas* (Figure 2.7), est la première espèce de Mollusques cultivée au monde avec 4 429 337 tonnes produites en 2004 soit 34% de la production mondiale conchylicole pour une valeur de 2 693 147 000 \$US (FIGIS, 2006). Initialement produite au Japon, sa croissance rapide et sa grande tolérance aux variations environnementales ont permis de développer sa production à travers le monde. Elle a été introduite dans des pays producteurs d'huîtres afin de pallier une chute de la ressource ou même dans des pays qui ne cultivaient pas les huîtres. Moins susceptible aux maladies, elle a remplacé, en France, l'huître portugaise, *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1818) en 1966, pourtant considérée comme la même espèce (Huvet *et al.*, 2002). Sa zone de répartition est maintenant très vaste d'autant plus que de nombreux échanges entre les pays, pour des problématiques de culture ou de maladies, ont lieu (Figure 2.8). Espèce hermaphrodite protandre, les individus les plus jeunes sont majoritairement mâles, et les plus âgés femelles. Mais une réversion sexuelle, sous contrôle génétique, peut s'observer dans le cas d'une limitation par la nourriture (Gosling, 2003). La gamétogenèse de l'huître creuse commence à partir de 10°C pour des salinités entre 15‰ et 32‰ alors que la ponte a lieu généralement au-dessus de 20°C et rarement entre 15°C et 18°C. Les larves sont captées en milieu naturel ou élevées en éclosiers pour débiter une nouvelle production. La taille commerciale (30 g en France) peut être atteinte après 18 à 30 mois de grossissement. Depuis le début des années 80, la production d'individus triploïdes a permis d'augmenter la production et de la vendre tout au long de l'année. En effet, cette innovation produisait des individus développant peu leurs gonades au profit de la croissance (Allen et Downing, 1990; Nell, 2002). Enfin, l'huître creuse, malgré sa large répartition, n'a que très peu de maladies connues, mettant en cause des parasites ou des bactéries du type *Vibrio* spp. Il faut noter toutefois des épisodes de mortalités massives estivales, comme en France, ou hivernales, comme sur la côte Ouest des Etats-Unis d'Amérique. Les récentes études sur ces mortalités ont montré le caractère multifactoriel de leur cause, notamment les pratiques de culture et la ploïdie des individus (Gagnaire *et al.*, 2006b).

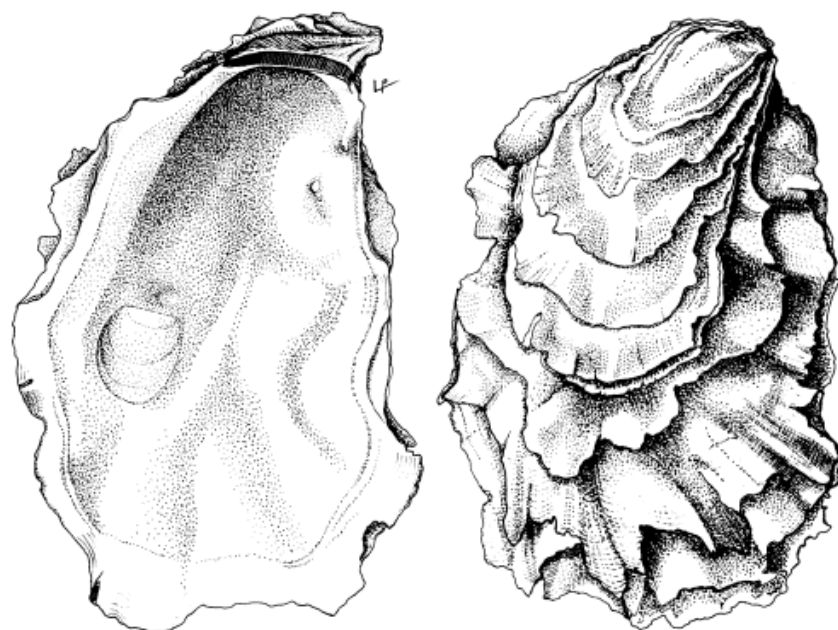


Figure 2.7: *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (source : [www.fao.org](http://www.fao.org) accédé le 12 septembre 2006)



Figure 2.8: Répartition géographique de l'espèce *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) production et introduction d'individus réunis (source : [www.fao.org](http://www.fao.org) accédé le 12 septembre 2006).

### **D. La moule, *Mytilus edulis* (Linné, 1758) et *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)**

La moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis*, est répartie sur tout le pourtour méditerranéen et en Galice, mais son étendue précise demeure difficile à déterminer. En effet, cette espèce est très proche de la moule bleue, *Mytilus edulis* (Figure 2.9), distribuée en Europe du Nord et en Amérique du Nord (Figure 2.10). La difficulté provient de la diversité de formes et de couleurs rencontrées dans leur habitat spécifique. C'est pourquoi, la moule méditerranéenne est considérée par certains auteurs comme une variété de *Mytilus edulis*, *Mytilus edulis galloprovincialis* (Figueras, 2006; Gouletquer, 2006). Cette large répartition naturelle est due à la forte tolérance de la moule aux variations de salinité, de température, de dessiccation et d'oxygène. Elle peut vivre dans des zones intertidales, subtidales jusqu'à 40m de profondeur, sur des supports rocheux ou vaseux. La moule est euryhaline et peut vivre dans des eaux douces, saumâtres ou marines. Néanmoins, sa croissance diminue dans des eaux de salinité inférieures à 18‰. La moule est aussi eurytherme ; elle peut vivre sous les glaces comme au Canada. La limite supérieure de tolérance chez les adultes est de 29°C. Sa production, en 2004, était de 1 860 249 tonnes, soit 14% de la production conchylicole mondiale (FIGIS, 2006). La moule est une espèce gonochorique et la période de ponte est très variable. Néanmoins, en Europe, la moule pond au début du printemps et à l'automne. Au Canada, dont la production a débuté en 1984, dans les eaux du Saint Laurent ou dans le Golfe du Saint Laurent, la ponte peut avoir lieu de mai à septembre (MPO, 2003; Cartier *et al.*, 2004). Plusieurs maladies sont associées à des parasitoses, des vibrioses ou des maladies virales, mais elles sont rarement mortelles. Enfin, les moules du Golfe du Saint Laurent développent des néoplasies.



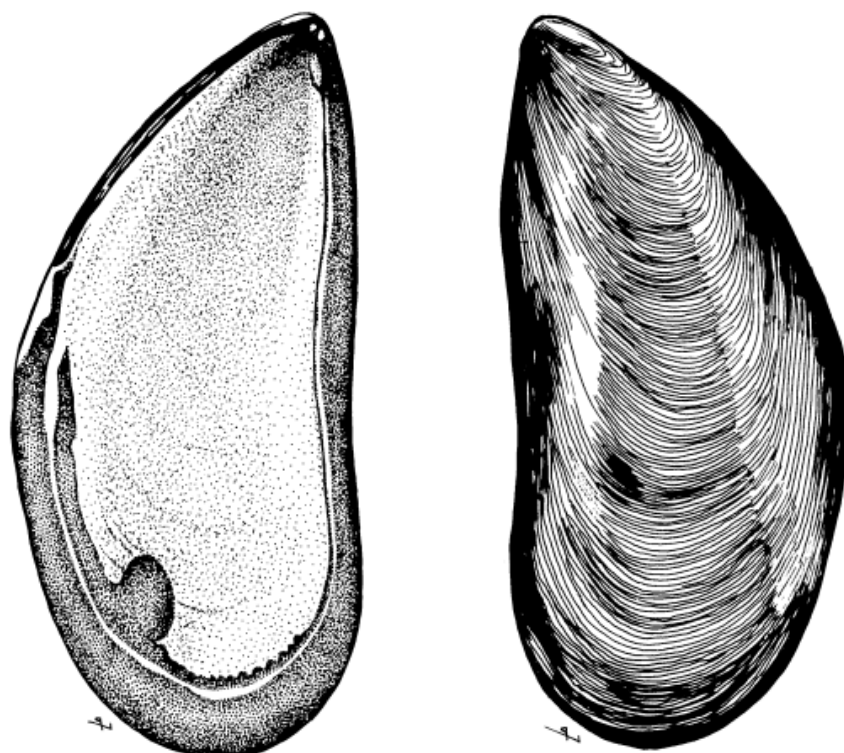


Figure 2.9: La moule, *Mytilus edulis* (Linné, 1758) et *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (source : [www.fao.org](http://www.fao.org) accédé le 12 septembre 2006)



Figure 2.10 : Répartition géographique de l'espèce *Mytilus edulis* et *galloprovincialis* production et population naturelles réunies (source : [www.fao.org](http://www.fao.org) accédé le 12 septembre 2006).

### **E. Des organismes soumis aux maladies**

Cultivés par l'homme ou vivant en populations sauvages, les bivalves sont soumis à différents agents pathogènes. Ces organismes, virus, bactéries, eucaryotes unicellulaires ou pluricellulaires sont naturellement présents dans la colonne d'eau. Les bactéries et des virus ont un rôle majeur dans le recyclage de la matière minérale, la boucle microbienne, pour la croissance du phytoplancton. Mais les pratiques d'élevage ainsi que des facteurs environnementaux, comme la température, peuvent avoir un impact sur la présence et la concentration dans la colonne d'eau des agents pathogènes (Ford et Chintala, 2006). Les bivalves, comme toute espèce, doit se défendre contre l'introduction de ces éléments étrangers dans leur organisme. Des cellules circulant dans l'hémolymphe, le fluide interne, assument ce rôle : les hémocytes.

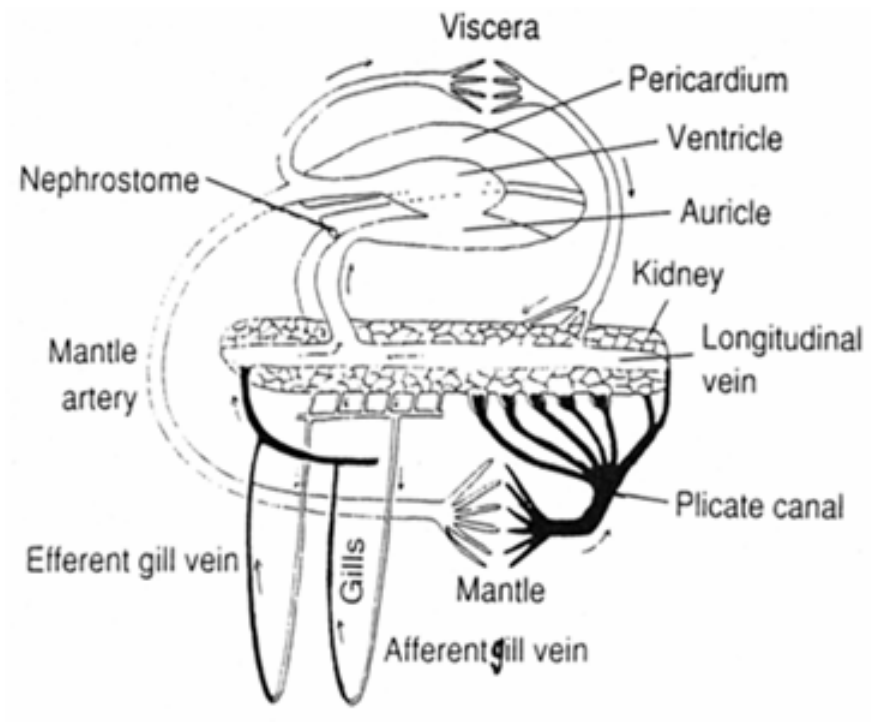


Figure 2.11 : Schéma de l'appareil circulatoire semi-ouvert chez les bivalves. Il est discontinu au niveau de sinus. L'hémolymphe est le tissu dans lequel circulent les hémocytes. Des hémocytes ont également migré dans le sinus péricardique par diapédèse (*in* Gosling, 2003 d'après Bolledail *et al.*, 1961).

## **IV. Les hémocytes, cellules circulantes et pluripotentes chez les Bivalves**

### **A. Les différents types d'hémocytes**

Que ce soit par des observations morphologiques (Auffret, 1988; Wootton *et al.*, 2003) ou ultrastructurales (Bachere *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005), par la cytométrie en flux (Auffret et Oubella, 1995; Brousseau *et al.*, 2000; Auffret *et al.*, 2004; Goedken et De Guise, 2004) ou par l'utilisation de marqueurs membranaires (Noel *et al.*, 1994; Dzyrynda *et al.*, 1997; Xue *et al.*, 2001; Jing et Wenbin, 2005), plusieurs sous populations hémocytaires coexistent dans l'hémolymphe des bivalves, donnant lieu à différentes classifications dépendamment des espèces et des auteurs (Auffret, 1988; Hine, 1999). Néanmoins, tous s'accordent à décrire chez les Bivalves deux grandes classes d'hémocytes : les granulocytes et les hyalinocytes. Les granulocytes sont majoritairement éosinophiles et contiennent de nombreuses granules cytoplasmiques (Figure 2.12). Ce type hémocytaire se retrouve chez de nombreux représentants des Bivalves mais semble absent chez les Pectinidés (Auffret, 1988). Ils présentent un rapport nucléoplasmique faible et un noyau excentré, le plus souvent sphérique mais parfois ovoïde. Leur proportion dans l'hémolymphe change selon la période de l'année, le site de résidence des individus et les variations de température et de salinité (Auffret et Oubella, 1995). Les granulocytes sont souvent associés à une activité de phagocytose importante (Goedken et De Guise, 2004) et ainsi défendent l'organisme contre des bactéries ou des parasites protozoaires après fusion intracytoplasmique avec les granules. Mais ils peuvent aussi phagocyter des algues, des débris cellulaires, des billes de latex (Brousseau *et al.*, 1998) ou du carbone particulaire (Hine, 1999). Selon les espèces, la taille et la forme des granules cytoplasmique peuvent varier. Les granulocytes d'une même espèce peuvent aussi avoir plusieurs types de granules (Noel *et al.*, 1994). L'activité de phagocytose, comme chez *Crassostrea virginica* (Goedken et De Guise, 2004), la production de peptides antimicrobiens, comme chez *Mytilus edulis* (Mitta *et al.*, 2000), ou encore la présence de récepteurs d'interleukines, comme chez *Mytilus galloprovincialis* (Barcia *et al.*, 1999) peuvent être différentes selon ces sous populations hémocytaires. Les hyalinocytes se définissent par l'absence de critères des granulocytes (Figure 2.12). Ils ne possèdent pas, ou peu, de granules cytoplasmiques et ont une coloration basophile. Néanmoins, cette population hémocytaire apparaît comme, elle aussi, hétérogène, dans la forme du noyau notamment

(Auffret, 1988). Ces hyalinocytes semblent être moins immunocompétents que les granulocytes. Chez *Crassostrea virginica*, les hyalinocytes phagocytent moins et émettent moins de radicaux oxydants (Goedken et De Guise, 2004). La discrimination entre ces deux classes d'hémocytes n'est pas aisée. En effet, les granules peuvent être vidées lors de la phagocytose et dès lors ces hémocytes perdent leurs critères de granulocytes. Néanmoins, différentes études ont montré des différences antigéniques entre les sous populations hémocytaires chez *Mytilus edulis* (Noel *et al.*, 1994; Dyrinda *et al.*, 1997), chez *Ostrea edulis* (Xue *et al.*, 2001), ou encore chez *Chlamys farreri* (Zhang *et al.*, 2004; Jing et Wenbin, 2005; Jing et Wenbin, 2006) sans pour autant parvenir à comprendre et expliquer l'ontogénie des hémocytes.

### **B. Les fonctions des hémocytes**

Seules cellules présentes dans l'hémolymphe, les hémocytes doivent pourtant assumer toutes les fonctions des cellules circulantes : la défense de l'organisme, le transport et la digestion de nutriments (Fisher, 1986; Bachere *et al.*, 2004). Cette totipotence est liée à la capacité atavique des cellules : l'endocytose soit de particules solides, la phagocytose, soit de fluides, la pinocytose (Fisher, 1986). Les hémocytes ont un rôle également d'excrétion. Les cellules séreuses, proches structuralement des hémocytes présentent dans les glandes péricardiques ont un rôle dans l'excrétion des métabolites (Cheng, 1981; Hine, 1999). A la frontière de la fonction de nutrition et de la fonction de défense, les hémocytes transportent aussi les éléments minéraux et protéiques pour la constitution de la coquille ou interviennent dans l'osmorégulation (Gosling, 2003; Bachere *et al.*, 2004). Enfin, les hémocytes jouent un rôle dans la détoxification de l'organisme en piégeant dans les lysosomes les métaux lourds, comme dans le cas du mercure (Marchi *et al.*, 2004).

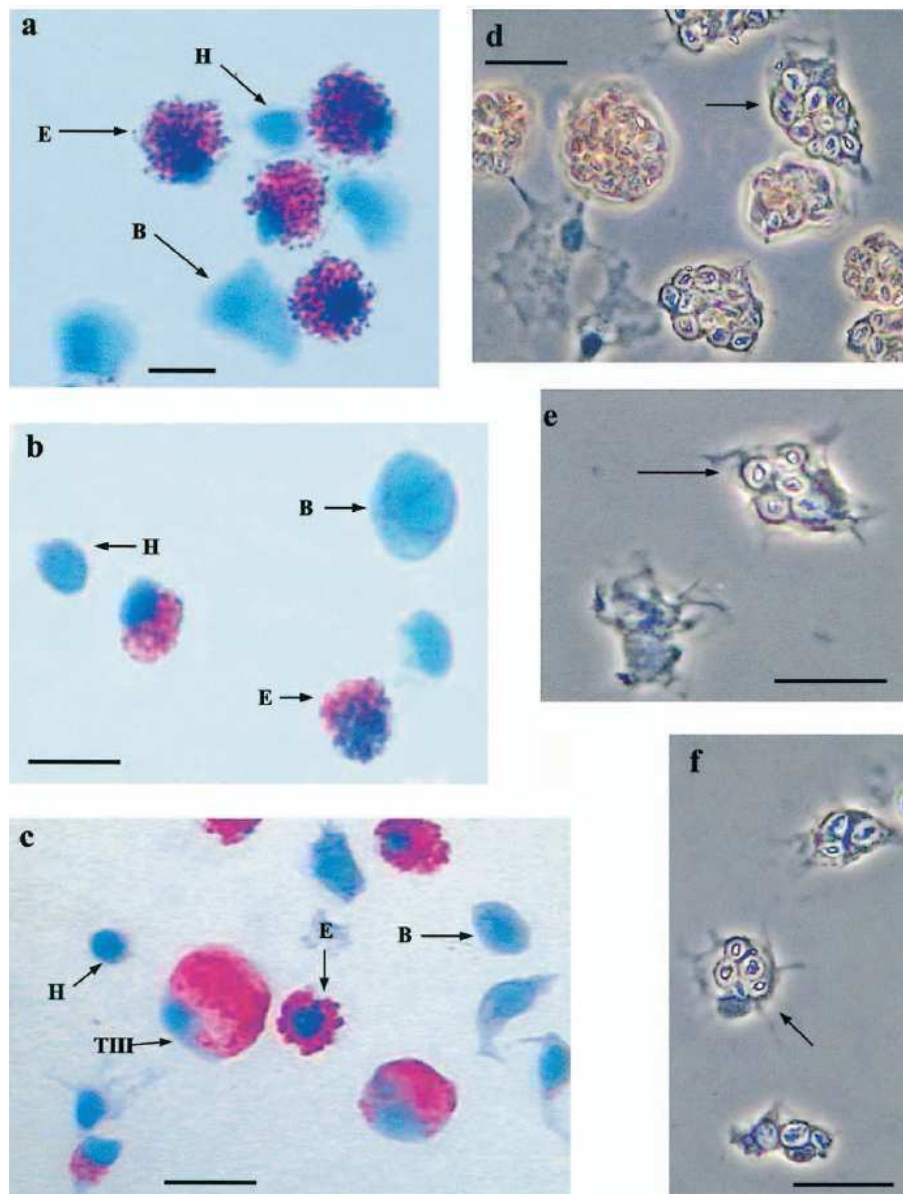


Figure 2.12 : Observations par microscopie optique de préparation d'hémocytes. Les barres représentent 10µm (a – c). Les hémocytes ont été cytocentrifugés puis colorés par la coloration de Wright. H, hyalinocytes ; E, granulocyte éosinophile ; B, granulocyte basophile; TIII, hémocytes éosinophile de type III. (a) *M. edulis*, (b) *E. siliqua* et (c) *C. edule*. (d–f) Monocouche d'hémocytes ayant phagocyté du zymosan (flèche). (d) *M. edulis*, (e) *E. siliqua* et (f) *C. edule* (in Wooton et al, 2003).

### **C. Le centre hématopoïétique chez les Mollusques**

La connaissance de l'ontogénie des hémocytes est nécessaire pour appréhender correctement le fonctionnement du système immunitaire chez les bivalves, notamment comprendre l'origine de la présence de plusieurs populations hémocytaires dans l'hémolymphe. Pourtant, sur l'ensemble des espèces formant l'embranchement des mollusques, un centre hématopoïétique n'a été mis en évidence que chez un gastéropode pulmoné, *Biomphalaria glabrata*. Ce centre producteur de cellules circulantes, appelé APO (amebocyte producing organ) est constitué d'une enveloppe conjonctive entourant le péricarde. Son ultrastructure révèle la présence de deux catégories de leucocytes : les hyalinocytes et les granulocytes qui interviennent dans l'immunité innée à médiation cellulaire chez cette espèce (Jeong KH *et al.*, 1983). Dans la famille des Pectinidés, apparue après les ostréidés et les mytilidés (Gosling, 2003), un tissu hématopoïétique diffus a été mis en évidence, chez *Chlamys farreri*, par immunohistochimie du marquage d'hémocytes à l'aide d'anticorps monoclonaux (Jing et Wenbin, 2005; Xing et Zahn, 2005). Chez les autres espèces de bivalves, aucun tissu équivalent n'a encore été mis en évidence et l'ontogénie des hémocytes reste inconnue, même si plusieurs hypothèses sont avancées (Auffret, 1988; Hine, 1999).

## **V. Le système immunitaire des Bivalves**

### **A. Mécanismes cellulaires du système immunitaire**

Chez les Bivalves, le système immunitaire repose sur des mécanismes de type inné. Les hémocytes jouent un rôle primordial dans ce système de défense. Ces cellules ont la capacité de s'agréger sous l'effet d'un stress mécanique ou chimique (Auffret et Oubella, 1997) et de former un clou homéostatique en cas d'inflammation (Fisher, 1986, 1988). Contrairement aux Vertébrés, ce phénomène est réversible, soulignant encore la plasticité fonctionnelle de ces cellules. Mais cette agrégation cellulaire peut être considérée comme une coopération cellulaire pour l'encapsulation de parasites dans des kystes de fibres protéiques. De manière similaire, les cellules du manteau peuvent enkyster un corps étranger en formant de la nacre. Mais, la fonction majeure de défense immunitaire à médiation cellulaire chez les Bivalves est la phagocytose et ses fonctions connexes, comme la production de radicaux oxydants microbicides. Ce système de défense cellulaire, lié à la fonction d'alimentation cellulaire (Fisher, 1988; Canesi *et al.*, 2002; Bachere *et al.*, 2004), est très conservé dans l'évolution (Salo *et al.*, 2005). Ainsi, des lymphocytes, pourtant spécialisés dans la défense immunitaire acquise et humorale, conservent des propriétés de phagocytose chez les premiers Vertébrés (Li *et al.*, 2006). La phagocytose se compose en plusieurs étapes similaires, chez les Invertébrés comme chez les Vertébrés : 1) la reconnaissance, 2) l'attachement, 3) internalisation de l'antigène, 4) fusion de la vacuole de phagocytose avec des lysosomes, 5) digestion de l'antigène 6) excrétion des lysats (Galloway et Depledge, 2001). La digestion des agents étrangers ingérés se fait par fusion des figures de phagocytose (phagosomes) et des lysosomes où sont stockés les agents oxydants microbicides. Ce métabolisme oxydatif peut être mesuré en réponse à des challenges bactériens (Lambert *et al.*, 2003) ou être modulé par des facteurs chimiques exogènes (Oliver *et al.*, 2001; Gagnaire *et al.*, 2004; Gagnaire *et al.*, 2006c). Enfin, l'intégration de la fonction immunitaire au niveau de l'organisme semble reposer sur des systèmes moléculaires, comme la prophénoloxydase (Munoz *et al.*, 2006), ou grâce à un ensemble de facteurs humoraux qui interviennent dans la communication cellulaire (Galloway et Depledge, 2001).



## **B. Peptides antimicrobiens et autres facteurs humoraux**

Dans le sérum de l'hémolymph des bivalves circulent des facteurs humoraux comme des lectines, des enzymes lysosomales ou des peptides antimicrobiens. Même si ces molécules sont produites par les hémocytes, ils interviennent dans l'immunité innée humorale (Bayne, 2003). Les enzymes lysosomales sont issues des lysosomes présents dans les hémocytes. Les lectines sont des glycoprotéines qui ont une structure très variable et permettent la reconnaissance des bactéries, leur agglutination ou leur adhésion aux hémocytes et parfois l'osponisation de la phagocytose (Canesi *et al.*, 2002). Des cytokines, type IL-2, ont également été mises en évidence chez plusieurs espèces de bivalves (Barcia *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2003; Ottaviani, 2006), témoins d'une similitude atavique avec les cellules NK (natural killer) de la défense immunitaire cellulaire chez l'homme (Ottaviani, 2006). Des peptides antibactériens ont été mis en évidence dans les épithéliums ou encore dans les granules des cellules circulantes et dans le plasma chez les Insectes et les Crustacés (Bachere *et al.*, 2004). Plus récemment des peptides antibactériens ont été mis en évidence par les mêmes méthodes chez les moules. Ces peptides sont regroupés en quatre groupes d'isoformes. Les défensines sont des peptides à 6 cystéines, semblables aux défensines des Arthropodes, ou à 8 cystéines, spécifique aux moules espèce *edulis* et *galloprovincialis*. Elles ont été mises en évidence dans le plasma et les hémocytes. Les mytilines existent sous la forme de 2 isoformes (A et B) dans le plasma de *edulis* et 3 isoformes (C, D et G1) dans les hémocytes de *galloprovincialis*. Les myticines ont été mises en évidence dans le plasma pour les deux isoformes A et B, et dans les hémocytes pour le seul A. Ces deux derniers groupes de peptides antibactériens sont des molécules originales de ce genre. Enfin, la mytimycine est un antifongique de 6,5 kDa. Leur spectre d'action diffère selon ces groupes. Ainsi, les défensines et les myticines ont une forte activité bactéricide contre les bactéries Gram<sup>+</sup> et quelques pathogènes marins, comme des *Vibrio*. Par contre, ils ont une activité plus faible contre les bactéries Gram<sup>-</sup>. Les myticines ont une activité également antifongique. Les mytimycines ont une activité strictement antifongique, et les mytilines ont un spectre d'action plus large. Leur cinétique d'action peut varier de quelques minutes à quelques heures. Ces peptides ne sont pas distribués également dans les hémocytes. Ainsi, dans le tube digestif se trouvent des hémocytes produisant majoritairement des défensines alors que dans les branchies se retrouvent des hémocytes produisant exclusivement des mytilines. Dans le liquide circulant, les sous populations hémocytaires ne semblent pas non plus produire les mêmes peptides. Les granulocytes à

larges granules sont producteurs de mytilines et représentent 37% de l'ensemble de la population hémocytaire alors que les défensines sont produites par des 16% des granulocytes. Par contre, 32% des hémocytes produisent des défensines et des mytilines. Enfin, 15% des hémocytes ne produisent aucun de ces peptides antibactériens (Figure 2.13). Des marquages à l'or montrent que les bactéries phagocytées par les hémocytes vont fusionner seulement avec les granules contenant les mytilines. Ces peptides agissent en deux temps : une phase précoce plasmatique et une phase tardive issue de la fusion de granules. Ce modèle d'immunité est semblable au fonctionnement du système des neutrophiles humains et des  $\alpha$ -défensines (HNP), même si les peptides sont, chez la moule, structuralement proche des Insectes (Mitta *et al.*, 2000).

### **C. Les réponses anticipées du système immunitaire chez les Invertébrés**

Parce que longtemps basée sur la recherche de mécanismes cellulaires ou humoraux d'immunité acquise à partir de ceux existants chez les Vertébrés, aucune étude immunologique chez les Invertébrés n'avait démontré de telles réponses immunitaires. Néanmoins, de récentes études phénoménologiques démontrent des caractères de mémoire immunitaire chez les Invertébrés, les réponses anticipées, notamment chez les Arthropodes (Little *et al.*, 2005). Ainsi des greffes de tégument de donneurs génétiquement différents entraînaient des rejets plus rapides après le deuxième essai. Plusieurs études sur les Crustacés ou les vers de terre ont mis en évidence une augmentation de la protection contre des agents pathogènes lors du deuxième challenge. Encore, des sauterelles en contact avec des parasites étaient significativement moins infectées au deuxième contact, lorsque ces parasites étaient de même souche. Néanmoins, ces réponses ne peuvent être considérées strictement comme équivalentes à l'immunité acquise des Vertébrés car la deuxième réponse n'est pas significativement plus importante que la première, rendant improbable l'existence d'une prolifération cellulaire de clones issus de la première infection (Little *et al.*, 2005). Cette observation globale de l'immunité chez les Invertébrés met ainsi en évidence un contrôle génétique et cellulaire différent et donc une mécanistique indépendante de celle observée chez les Vertébrés (Bayne, 2003). Actuellement, à notre connaissance, de telles réponses n'ont pas encore été démontrées chez les bivalves.

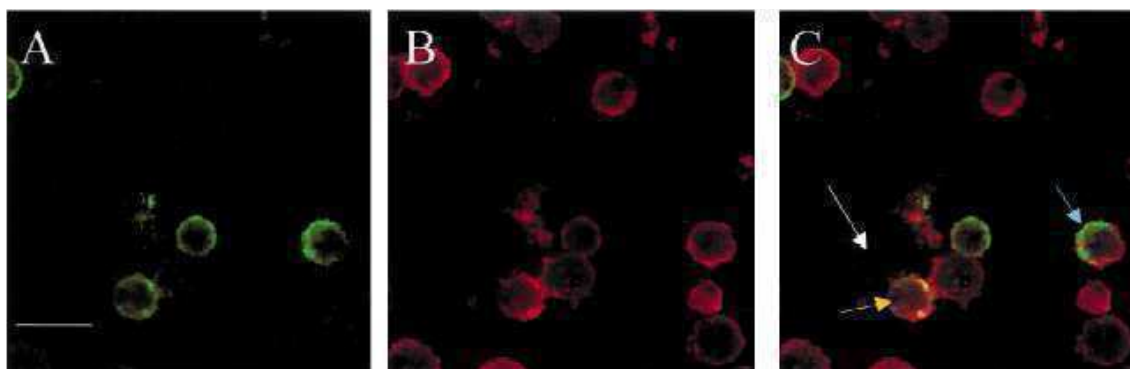


Figure 2.13 : Photographies d'imagerie confocale démontrant la présence de défensines marquées au FITC (A) et de mytilines marquées au rouge texan (B). C montre la présence conjointe des peptides antibactériens dans des compartiments cytosoliques différents (flèche bleue) ou identique (flèche jaune). Certains hémocytes ne contiennent ni de défensines ni de mytilines (flèche blanche). In (Mitta et al., 2000)

## **VI. Immunotoxicologie et santé de l'environnement**

### **A. L'immunotoxicologie**

Un effet immunotoxique est défini, par Galloway et Depledge (2001) ou Woolhiser (2005), comme l'effet d'une molécule qui module les paramètres du système immunitaire. En effet, si une diminution de la performance du système immunitaire est intuitivement interprétée comme un effet néfaste pour l'organisme, une augmentation doit aussi être entendue comme un déséquilibre du fonctionnement « normal » de la défense de l'organisme. La toxicologie du système immunitaire, ou l'immunotoxicologie, s'est largement développée ces vingt dernières années et a permis de mettre en évidence une vision nouvelle de la fonction immunitaire, notamment en forte interaction avec le système nerveux chez les mammifères (Woolhiser *et al.*, 2005). L'immunotoxicologie a rapidement été utilisée pour l'évaluation du risque environnemental de substances chimiques, suite aux évidences épidémiologiques d'altération de la santé humaine, corrélée à des expositions à des molécules ne ciblant pourtant pas le système immunitaire (Luster *et al.*, 1992; Luster *et al.*, 1993; Krzystyniak *et al.*, 1995). Depuis, de nombreux xénobiotiques ont démontré des effets immunotoxiques sur les vers de terre (Goven *et al.*, 2005), les Reptiles (Rooney, 2005) et d'autres représentants de la faune (Smits, 2005), les Amphibiens (Rollins-Smith et Smits, 2005), les Mammifères marins (De Guise, 2005) les Poissons (Duffy et Zelikoff, 2005) et les Bivalves (Auffret, 2005). Néanmoins, l'utilisation des outils immunotoxicologiques en toxicologie humaine, ou en écotoxicologie, restent largement ouverts, d'une part à cause des nombreuses interactions avec d'autres facteurs internes et externes à l'organisme (Selgrade, 1999; Galloway et Depledge, 2001; Richter-Reichhelm *et al.*, 2001; Galloway et Handy, 2003; Selgrade, 2005), mais aussi à cause du manque de connaissance concernant le fonctionnement du système immunitaire d'organismes sentinelles (Woolhiser *et al.*, 2005). D'autre part, un certain nombre de questions restent en suspens concernant leur utilisation pour évaluer la qualité de l'environnement, dû à un manque de données objectives reliant des variations du systèmes immunitaire et la susceptibilité à la maladie (Adamo, 2004), notamment chez les bivalves (Oliver et Fisher, 1999).

## **B. Les mécanismes immunotoxiques des pesticides**

Actuellement, de nombreuses molécules se révèlent immunotoxiques tant pour l'homme que pour les animaux (Tableau 4). La particularité des pesticides est d'être délibérément libérés dans l'environnement à des fins d'exercer leur toxicité. Mais cette toxicité peut également agir sur le système immunitaire chez les organismes non cibles. Chez les souris, le dieldrin, pesticide utilisé dans les années 70 et 80 pour la culture de maïs et de coton, induisait une immunosuppression en inhibant l'activation des macrophages, la réactivité des lymphocytes ou encore, la réaction de rejet de greffe (Krzystyniak *et al.*, 1986; Bernier *et al.*, 1987; Hugo *et al.*, 1988a; Hugo *et al.*, 1988b; Krzystyniak *et al.*, 1989). En 1987, l'agence américaine de protection de l'environnement (EPA) a banni son utilisation. D'une manière générale, les pesticides peuvent provoquer des altérations histopathologiques sur les organes immunitaires, altérer la maturation des cellules immunocompétentes, induire des modifications dans les populations de cellules B et T, altérer des fonctions immunitaire en inhibant des systèmes enzymatiques ou en perturbant des voies de transduction de signaux permettant le contrôle des fonctions immunitaires (Voccia *et al.*, 1999; Galloway et Depledge, 2001). Mais, ces xénobiotiques peuvent également induire indirectement des effets immunotoxiques en agissant sur le système nerveux ou en altérant le métabolisme dans les organes immunitaires. Ces perturbations entraînent alors des pathologies du système immunitaire, tels que des hypersensibilités ou des maladies autoimmunes (Blakley *et al.*, 1998b, 1998a, 1999; Galloway et Handy, 2003). Ces pesticides peuvent aussi avoir des effets immunotoxiques chez d'autres modèles animaux, tels que des Amphibiens (Christin *et al.*, 2004) des espèces aquatiques (Luebke *et al.*, 1997; Galloway et Depledge, 2001) Ainsi, l'atrazine, utilisée pour traiter les cultures de graminées, et le diuron, dérivé uréique utilisé comme herbicide ou dans les nouvelles peintures antisalissures (Chesworth *et al.*, 2004), régulent l'expression de plusieurs familles de gènes chez *Platichthys flesus* (Marchand *et al.*, 2006) et chez *Crassostrea gigas* (Tanguy *et al.*, 2005). L'atrazine altère, *in vitro*, l'activité peroxidasique du système immunitaire de *Crassostrea gigas* (Gagnaire *et al.*, 2003) ainsi que la cellularité et la phagocytose des hémocytes chez *Lymnaea stagnalis*, gastéropode d'eau douce, à des concentrations environnementales (Russo et Lagadic, 2004). Le diuron, lui, perturbe sévèrement la réponse inflammatoire (Couderc *et al.*, 1983).

Tableau 5: Exemples de substances chimiques, par classe, pouvant induire des effets immunotoxiques (Galloway et Depledge, 2001)

Polyhalogenated aromatic hydrocarbons	Oxidant gases
TCDD	nitrogen dioxide
PBB	ozone
PCBs	sulphur dioxide
Metals	Natural products
lead	oestrogen
arsenic	mycotoxins
methylmercury	plant alkyls
Solvents	Particles
benzene	silica
toluene	asbestos
Polycyclic aromatic hydrocarbons	Aromatic amines
BaP	benzidine
DMBA	acetyl aminofluorene
Pesticides	Organotins
carbofuran	butyltins
chlordan	phenyltins
malathion	
Complex mixtures	
sewage effluent	
land fill fly ash	
sediments	

TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; PBB, poly-brominated biphenyl; PCB, polychlorinated biphenyl; BaP, benzo(a)pyrene; DMBA, dimethylbenzanthracene.

### **C. Les mécanismes immunotoxiques des métaux lourds**

Les métaux lourds présents dans l'environnement, comme dans la région des Grands Lacs (Canada) sont aussi immunotoxiques (Zelikoff *et al.*, 1994; Bernier *et al.*, 1995a). Chez les souris, le mercure, par exemple, est piégé par les macrophages de souris dans des vacuoles (Cunha *et al.*, 2004), se fixe aux groupements thiols impliqués dans le métabolisme cellulaire (Mondal *et al.*, 2005) et induit des désordres immunitaires comme des maladies autoimmunes (Dieter *et al.*, 1983; Moszczynski, 1997) ou d'autres troubles neurotoxiques ou néphrites (Kazantzis, 2002). Le cadmium induit une immunosuppression chez des souris, après inhalation (Krzystyniak *et al.*, 1987). Chez d'autres espèces animales, notamment les modèles étudiés en écotoxicologie, Poissons, Bivalves ou Annélides, le mercure et ses composés perturbent aussi le fonctionnement du système immunitaire (Fugere *et al.*, 1996; Fournier *et al.*, 2001; Sweet et Zelikoff, 2001). D'autres métaux, comme l'argent, le cuivre, le cadmium, le zinc modulent la phagocytose d'hémocytes de plusieurs espèces de Bivalves exposées *in vitro* (Pipe *et al.*, 1999; Sauve *et al.*, 2002; Gagnaire *et al.*, 2004).

### **D. Immunotoxicité d'autres impacts anthropiques**

Un nombre important de substances chimiques d'origine anthropique altère le système immunitaire des animaux. Ainsi le système immunitaire des lombrics est affecté par les dépôts aériens issus de cimenteries sur le sol (Massicotte *et al.*, 2003; Massicotte *et al.*, 2004). Encore, l'activité de phagocytose des macrophages chez le choquemort, une espèce de poisson de rivière, est significativement inhibée chez les individus qui vivent en aval d'une papeterie, par rapport aux individus qui vivent en amont (Fournier *et al.*, 1998). Des mélanges complexes de xénobiotiques, comme des mélanges de pesticides, induisent des effets immunotoxiques chez les souris (Flipo *et al.*, 1992), même lors d'expositions subchroniques (Wade *et al.*, 2002) comme chez les Amphibiens (Christin *et al.*, 2003; Gendron *et al.*, 2003) ou chez les Bivalves (Gagnaire *et al.*, 2006c). Les perturbateurs endocriniens peuvent aussi avoir des conséquences immunotoxiques comme chez la souris (Pillet *et al.*, 2006) ou chez les Bivalves (Bouchard *et al.*, 1999; Canesi *et al.*, 2004b; Canesi *et al.*, 2006). De récentes études sur des moules d'eau douce, *Elliptio complanata*, ont démontré également le caractère immunotoxique et immunosuppresseur de nombreuses

nouvelles substances émergentes et de l'eau des bassins de décantation des usines de traitement des eaux domestiques (Gagne *et al.*, 2006b). Des mélanges plus complexes, comme les sédiments de ports industriels, induisent aussi des phénomènes immunotoxiques notables en inhibant la phagocytose chez des poissons benthiques, comme les plies américaines, ou chez des bivalves fouisseurs (Lacroix *et al.*, 2001; Fournier *et al.*, 2002). Enfin, une exposition *in vitro* à un champ magnétique, peut perturber le fonctionnement cellulaire de lymphocytes et de macrophages de souris en induisant l'apoptose et des changements en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Flipo *et al.*, 1998).

### **E. Conséquences immunotoxiques de la consommation d'aliments contaminés**

Outre les voies classiques d'exposition expérimentale (*in vitro*; injections, etc.) qui ont permis d'établir le potentiel immunotoxique de substances chimiques, d'autres voies d'exposition plus représentatives des conditions naturelles d'exposition doivent être étudiées afin de mieux évaluer le risque sur la santé (Bernier *et al.*, 1995b). C'est dans cet esprit que des protocoles d'exposition, mettant à contribution la consommation d'aliments contaminés, ont été développés. Ainsi, des souris nourries avec du gras de béluga du Saint Laurent provenant des sites fortement contaminés par les pesticides, développent, après 90 jours, des effets immunotoxiques importants sur l'immunité à médiation cellulaire ou humorale (Fournier *et al.*, 2000c). Les effets immunotoxiques de substances chimiques peuvent aussi se révéler sur la deuxième génération de souris dont les parents étaient nourris avec du poisson contaminé (Tryphonas *et al.*, 1998a; Tryphonas *et al.*, 1998b). L'étude de l'exposition à des périodes sensibles du développement permet également de mettre en évidence des effets immunotoxiques. Ainsi, l'exposition néonatale via le lait maternel de souris buvant de l'eau contaminée au Cadmium induit des effets immunotoxiques transitoires et persistants chez les souris jeunes ou adultes (Rooney *et al.*, 2003; Pillet *et al.*, 2005). Ces études, peu nombreuses, démontrent pourtant clairement les conséquences sur la santé chez des mammifères exposés indirectement par des aliments contaminés. Ce type d'étude demanderait des modèles représentatifs des écosystèmes marins.



## **F. Immunotoxicité et facteurs endogènes**

Les substances chimiques agissent sur le système immunitaire des animaux via plusieurs voies d'exposition, mais elles n'agissent pas de manière identique sur tous les individus. Ainsi, les effluents d'une papeterie provoquent des effets immunotoxiques différentiels chez les mâles ou les femelles choquemort (Fournier *et al.*, 1998). Des perturbations du système immunitaire, en fonction du sexe, sont également mises en évidence chez des souris, jeunes et adultes, exposées à de faibles doses de Cadmium via le lait maternel (Pillet *et al.*, 2005). Le stade de développement des individus peut moduler les effets immunotoxiques des xénobiotiques présents dans l'environnement. Chez le phoque gris, les cellules du système immunitaire, prélevées chez de jeunes phoques durant les cinq premières semaines après le sevrage, quand le système immunitaire est encore en développement, sont plus sensibles aux contaminations *in vitro* de mercure (Lalancette *et al.*, 2003). L'immunocompétence de lombrics exposés au mercure dépend, de même, de l'âge des individus (Sauve et Fournier, 2005). Il a été démontré chez les souris mâles que les interactions entre l'hypophyse, le thymus et le système immunitaire jouait un rôle dans la relation entre l'âge et la défense immunitaire (Rooney *et al.*, 2003).

## **G. L'évaluation du système immunitaire**

Actuellement, seule l'agence environnementale américaine a établi un guide pour les tests immunotoxicologiques sur rongeurs (US EPA, 1998), mais ils ne sont pas entièrement satisfaisants pour l'évaluation du système immunitaire chez d'autres modèles animaux, certains compartiments du système immunitaire des Mammifères n'existant tout simplement pas (Brousseau *et al.*, 1997). Néanmoins, plusieurs paramètres immunitaires peuvent être mesurés chez plusieurs espèces modèles en écotoxicologie (Brousseau *et al.*, 1997; Brousseau *et al.*, 1998; Salo *et al.*, 2005) et notamment chez les Bivalves (Auffret, 2005). Le système immunitaire comporte plusieurs compartiments et la caractérisation de son bon fonctionnement nécessite de bien évaluer l'intégrité de ces éléments structuraux Parmi les paramètres utilisables à cette fin chez les Bivalves nous pouvons mentionner: la cellularité (nombre d'hémocytes disponibles pour la défense immunitaire) et la mortalité hémocytaire. La qualité de fonctionnement des hémocytes doit, ensuite, être connue nécessitant une batterie de test afin de caractériser plusieurs paramètres fonctionnels. Des mécanismes cellulaires différents régissent chacun de ces paramètres et peuvent être perturbés par des xénobiotiques

(Auffret, 2005). Tous sont susceptibles d'être des points d'analyse du fonctionnement du système immunitaire, encore faut-il qu'ils soient mesurables et qu'ils existent, évidemment, dans l'espèce étudiée (Salo *et al.*, 2005). Parmi les différents paramètres, la faculté des hémocytes à internaliser les agents étrangers en est un de première importance (Fournier *et al.*, 2000a). Toutefois, sachant qu'une substance chimique peut induire des effets néfastes que sur certains compartiments, il est impératif de mesurer plusieurs paramètres structuraux et fonctionnels (Luster *et al.*, 1992; Luster *et al.*, 1993; Oliver et Fisher, 1999; Germolec, 2004).

### **H. L'analyse des paramètres immunitaires : intérêt de la cytométrie en flux**

L'analyse des paramètres immunitaires correspond, chez les Bivalves, à une analyse des paramètres cellulaires des hémocytes. De nombreux protocoles spectrophotométriques (absorbance d'un produit de dégradation enzymatique) ou optiques (coloration des hémocytes puis observation sous microscope) existent, mais l'instrument privilégié de la mesure des paramètres cellulaires est le cytomètre en flux. Un LASER éclaire un flux ascendant de cellules. La réflexion et l'ombre portée sont transcrites en signaux électriques par des photomultiplicateurs pour chaque cellule ou « événement ». Si les cellules ont préalablement été traitées par une sonde fluorescente, spécifique d'une structure ou d'une fonction cellulaire, alors le LASER excite cette sonde et la fluorescence émise est enregistrée par un troisième photomultiplicateur (Figure 16). L'ensemble des signaux électriques est transmis à un ordinateur. L'utilisateur accède ainsi à toutes les données physico-chimiques des cellules étudiées, cellule par cellule. Les logiciels associés permettent d'interroger graphiquement la base de ces données pour un échantillon. Plusieurs cytomètres existent actuellement sur le marché. Même s'ils fonctionnent tous sur le même principe, néanmoins, il existe des différences de conception de l'appareillage et de transduction du signal induit. Cet instrument dédié à la cytométrie et à la cytologie est utilisé largement dans les études immunologiques (Zola, 2000) et immunotoxiques (Brousseau *et al.*, 2000).

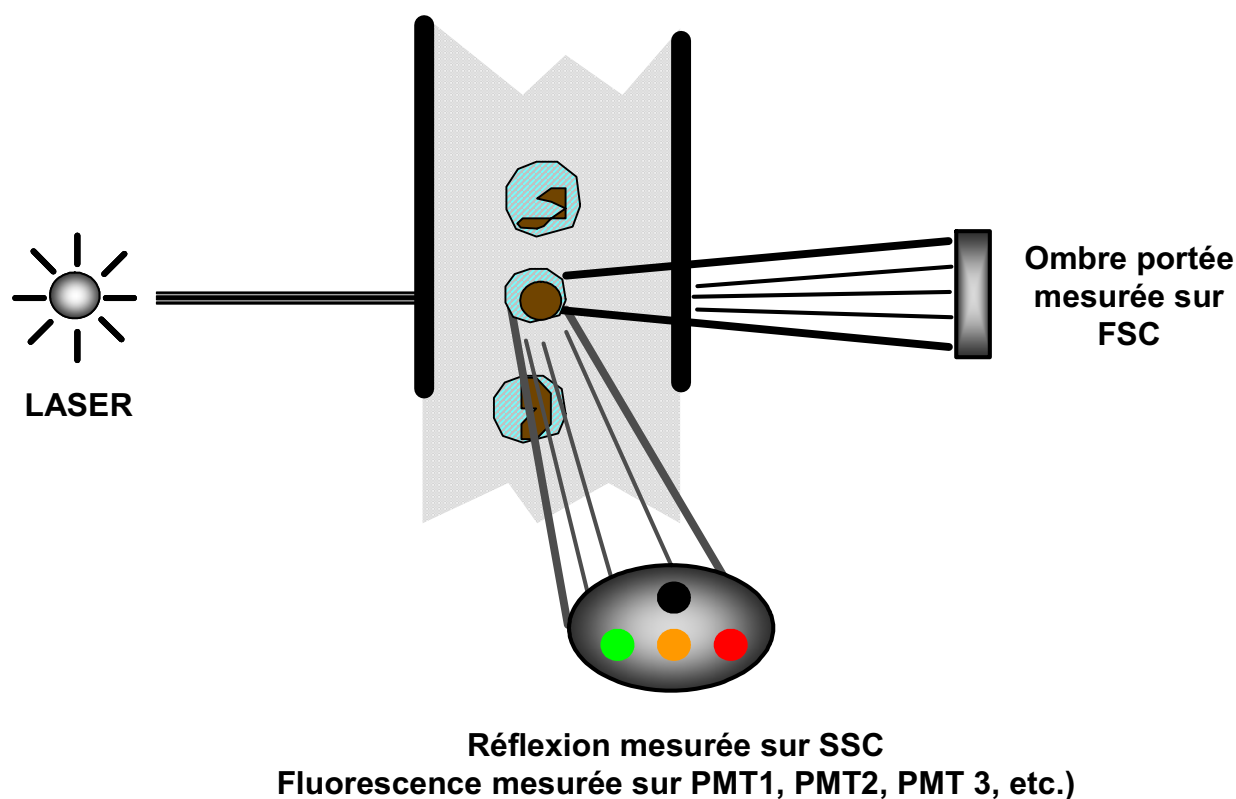


Figure 2.14: Schéma du principe de la cytométrie en flux. Chaque cellule entraînée dans le flux est excitée par un LASER. La taille et la complexité de l'événement sont enregistrées sur les capteurs FSCF et SSC. La fluorescence naturelle ou d'une sonde associée à une structure cellulaire est mesurée sur des photomultiplicateurs. L'ensemble des données est ensuite analysé par un logiciel dédié (d'après PUCL, [www.cyto.purdue.edu](http://www.cyto.purdue.edu)).

# 1. *Développement méthodologique*

---

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>77</b>
<b>II. COMPARAISON DES PARAMETRES IMMUNITAIRES D'HEMOCYTES PRELEVES DANS LA CAVITE PERICARDIQUE ET DANS LE SINUS DU MUSCLE ADDUCTEUR CHEZ L'HUITRE CREUSE, CRASSOSTREA GIGAS, PAR L'UTILISATION DE DEUX CYTOMETRES</b>	<b>79</b>
<b>III. ÉTUDES D'HARMONISATION DES METHODES D'ANALYSE DES PARAMETRES IMMUNITAIRES</b>	<b>80</b>
<b>IV. INDICATEUR DE LA CONDITION PHYSIOLOGIQUE GLOBALE D'UN INDIVIDU ET DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU PROTOCOLE D'EXPOSITION INDIVIDUELLE</b>	<b>110</b>
<b>V. APPLICATION DU NOUVEAU PROTOCOLE D'EXPOSITION «IN TUBO» : APPROCHE COMPARATIVE D'UNE EXPOSITION AU CHLORURE DE MERCURE</b>	<b>119</b>
<b>VI. OUTILS D'ANALYSE EN IMMUNOTOXICOLOGIE</b>	<b>120</b>
<b>VII. SYNTHÈSE</b>	<b>163</b>



## 1. Introduction

Les variations individuelles conjuguées aux facteurs confondants font obstacle à une utilisation pragmatique des outils immunotoxicologiques dans l'évaluation environnementale du risque chimique et d'une manière générale à toute étude écotoxicologique et écophysiologique sur cette famille de Mollusques. Notamment, la modélisation des paramètres physiologiques nécessite de bien comprendre le comportement d'un « individu moyen ». Cette partie s'attachera à étudier précisément les variations individuelles. Néanmoins, il est indispensable de s'assurer que les méthodes d'analyse du système immunitaire chez les bivalves ne sont pas eux-mêmes à l'origine de ces variations. C'est ainsi que dans l'optique d'harmoniser ces méthodes, un groupe de scientifiques européens et canadiens s'est formé pour constituer le Réseau Atlantique Bivalves. Les expériences et les connaissances en immunotoxicologie chez les bivalves ont ainsi pu être échangées au cours de trois réunions ateliers qui se sont déroulés à Brest en 2004 (PhagoBIM), à Québec en 2005 (HarmaBIM) et à nouveau à Brest en 2006 (EcoBIM). Les différents résultats sont présentés ici sous la forme d'un article scientifique. Il était nécessaire, aussi, afin d'améliorer les connaissances sur ces variations individuelles, de disposer d'une méthodologie adaptée à l'étude individuelle. Les précédentes études au LEMAR et à l'Institut Armand Frappier ont permis de développer des microméthodes d'analyse du système immunitaire des bivalves afin de pouvoir évaluer un ensemble de paramètres à partir d'hémolymphe prélevée sur un individu (Brousseau *et al.*, 1998; Auffret *et al.*, 2004). Néanmoins, les protocoles utilisés en conditions contrôlées ne sont pas pleinement satisfaisants quant à l'étude de cette problématique. En effet, les études *in vivo* traditionnelles chez les bivalves utilisent des « paquets de moules » et l'on ne peut être, finalement, jamais certain de l'homogénéité du traitement appliqué entre les moules situées en périphérie de ce paquet et celles au centre. D'un autre côté, les études *in vitro* permettent d'étudier, de manière précise, les effets d'un traitement sur les cellules de la défense immunitaire. Mais, au vu du faible quantité d'hémolymphe disponible, ces études interdisent des investigations sur les réponses individuelles au traitement. Le développement d'un nouveau protocole, appelé sous forme de clin d'œil « *in tubo* » est présenté en comparaison des deux précédents protocoles suite à une contamination au chlorure de mercure. Enfin, l'analyse du système immunitaire et de sa modulation en réponse aux variations chimiques du milieu nécessite la prise en compte de plusieurs paramètres (Auffret, 2005). Les paramètres considérés font d'ailleurs l'objet de

lignes directrices précises dans le cas d'études immunotoxicologiques chez les Vertébrés (EPA, 1998). En effet, des xénobiotiques peuvent n'avoir aucun effet sur certains paramètres et des effets significatifs sur d'autres. Pour soutenir la démarche du scientifique dans la formulation d'une conclusion, il est alors indispensable d'avoir à disposition une méthodologie permettant la prise en compte de tous les paramètres utilisés sous la forme d'un seul. Cette démarche est présentée dans la dernière partie de ce chapitre illustrée par deux articles publiés en 2004 et 2006.

***II. Comparaison des paramètres immunitaires d'hémocytes prélevés dans la cavité péricardique et dans le sinus du muscle adducteur chez l'huître creuse, Crassostrea gigas, par l'utilisation de deux cytomètres***



## **Hemocyte parameters comparison punctuated from the pericardial cavity and the adductor muscle sinus in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, using two flow cytometers**

Article en préparation

### **Authors**

Beatrice Gagnaire<sup>1,2</sup>, Matthieu Duchemin<sup>3,4</sup>, Michel Auffret<sup>3</sup>, Helene Thomas-Guyon<sup>1</sup> and Tristan Renault<sup>2\*</sup>

### **Affiliations**

<sup>1</sup>Centre de Recherche sur les Ecosystèmes Littoraux Anthropisés, UMR CNRS IFREMER Université de La Rochelle 6217-CRELA, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France

<sup>2</sup>IFREMER La Tremblade, Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), 17390 La Tremblade, France

<sup>3</sup>Laboratoire des sciences de l'environnement marin, UMR CNRS 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, place Nicolas Copernic, 29 280 Plouzane – France

<sup>4</sup>Institut Armand-Frappier, Institut National de la Recherche Scientifique, Campus de Pointe-Claire, 245 Hymus, Pointe-Claire, H9R 1G6, Quebec – Canada

\*Corresponding author:

T. Renault, LGP, 17390 La Tremblade, Tel : +33 5-46-76-26-49, Fax : +33 5-46-76-26-11, [trenault@ifremer.fr](mailto:trenault@ifremer.fr)

**Abstract**

Parameters related to hemocyte populations have been considered as relevant indicators of bivalve health and are currently used in ecophysiological, immunological and immunotoxicological studies. Hemocytes can be collected in bivalves by puncture whether in the pericardial cavity or in the adductor muscle sinus. Flow cytometry is a methodological approach adapted to the morphological and functional analysis of isolated cells and is increasingly used in laboratories for the study of hemocyte parameters in aquatic invertebrates. However, literature reports the use of various protocols for hemocyte processing in laboratories equipped with different analysers. In this context, two different flow cytometers (EPICS XL4, Beckman Coulter and FacsCalibur, Becton Dickinson) and two sites of hemocyte collection (pericardial cavity and adductor muscle sinus) were compared for the analysis of several hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Total hemocyte count, volume of hemolymph and total number of cells were measured using conventional techniques. Cell mortality, phagocytosis, lysosome presence, production of esterase and reactive oxygen species were monitored by flow cytometry. Results showed that values obtained for cell mortality and phagocytic index differed depending on the cytometer used. In addition, the phagocytic index was found higher for hemocytes obtained in the muscle sinus. The results are discussed with respect to the interest of flow cytometry as a tool for hemocyte studies in bivalves.

**Keywords**

Pacific oyster, *Crassostrea gigas*; flow cytometry; collection; hemocytes; phagocytosis.

## 1. Introduction

Bivalve molluscs have an open circulatory system consisting of a circulating compartment (heart, arteries and veins) lacking capillaries. Instead, a complex network of sinuses is localised in organs, the most important ones being localised in the pericardial cavity and in the adductor muscle (Cheng, 1981). As a consequence, hemolymph cells - or hemocytes - may either circulate in vessels but also, be resting in interstitial tissues of organs. Studies are currently realised in bivalve hemocytes collected either from the pericardial cavity (Cheng et Sullivan, 1984; Cheng et Downs, 1988; Sauve *et al.*, 2002; Gagnaire *et al.*, 2003) or from the adductor muscle sinus (Auffret *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2002; Canesi *et al.*, 2003; Gagnaire *et al.*, 2006c). These cells play a key role in non-specific defence mechanisms and many of the immune parameters are used for immunotoxicological diagnosis (Auffret, 2005). Bivalve hemocytes are considered to be equivalent to vertebrate phagocytic cells (Cheng, 1981). Hemocytes are involved in the recognition of invading pathogens and in their elimination by phagocytosis and encapsulation (Cheng, 1981; Fisher, 1986). Hydrolytic enzymes including esterases and release of reactive oxygen species (ROS) play a key role in pathogen degradation (Cheng et Rodrick, 1975; Pipe, 1992; Carballal *et al.*, 1997). Moreover, lysosomes have been described as a valid marker of cell viability (Moore *et al.*, 1978; Lowe *et al.*, 1995; Lowe et Fossato, 2000). They have been used as an immune capacity indicator in *Mytilus sp.* (Moore et Gelder, 1985; Torreilles *et al.*, 1997), particularly in response to various stress factors including pollution (Cajaraville *et al.*, 1996a; Galloway et Depledge, 2001). However, little is known about hematopoiesis, stem cells and their maturation (Auffret, 1988). A diffuse hematopoietic tissue was nevertheless reported in vesicle tissues around the adductor muscle in *Chlamys farreri* using immunohistochemistry (Xing et Zahn, 2005). In the absence of specific sites of hematopoiesis in other species, hemocytes are thought to originate from interstitial, mesenchymatous cells (Cheng, 1981). Thus, exploring either the functions of these cells or possible alterations induced by environmental stressors requires efficient methodologies in the domain of cell biology. Furthermore, any comparison of results obtained in different laboratories would be possible if standardized procedures are applied.

Flow cytometry is more and more used to analyse structure and function of bivalve hemocytes (Renault *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2001; Fournier *et al.*, 2002; Auffret *et al.*, 2004; Auffret *et al.*, 2006; Gagnaire *et al.*, 2006c). This tool used massively in cell analysis draws forward (FSC) and scatter (SSC) optical parameters from a cell flow light up by a LASER beam. These optical parameters are then translated into electronic signals to a computer where

software helps processing data. In this context, a comparative study has been conducted in a common biological model in marine bivalve studies, the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in two laboratories equipped with different flow cytometers using the same software. The questions to be addressed focused on: i) the hemocyte parameters considering the site for hemolymph collection and ii) the type of cytometer used for cell analyses. Several hemocyte parameters including cell viability, oxygen-dependant antimicrobial activity and esterase production, lysosome presence and phagocytic index were measured according to standardised flow cytometry protocols. Total hemocyte count (THC), volume of hemolymph and total number of cells were also monitored using conventional methods.

## 2. Material and Methods

### *Oysters*

Pacific oysters, *C. gigas*, with a shell length of 2-3 cm, were produced in the IFREMER hatchery at La Tremblade laboratory (Charente-Maritime, France) in February 2002. The oysters were reared for 16 months in external raceways. The same batch of oysters was used for the experiments conducted in Brest and in La Tremblade.

### *Assay schedule*

The analyses were performed in June 2003 in Brest (Brittany, France) using a FacsCalibur® (Becton Dickinson) and three weeks later in La Tremblade (Charente-Maritime, France), using an EPICS XL4® (Beckman Coulter). These two benchmark flow cytometers are both equipped with a 488 nm argon-ion laser beam. Data were processed using WinMDI 2.8 software (Windows version). When animals had to be transferred, they were kept in seawater, at ambient temperature, for one night and proceed the day after the transfer.

### *Hemolymph collection*

Hemolymph was withdrawn with the use of a 1-mL syringe equipped with a needle (0.9x25 mm) either in the pericardial cavity after opening carefully the shell, or in the sinus of the adductor muscle after breaching the shell using pincers (Auffret et Oubella, 1994). For each oyster, 0.5-1.5 mL of hemolymph was collected. After collection, hemolymph samples were filtered on a 80 µm mesh to eliminate aggregates. The hemolymph was maintained on ice until processing to reduce spontaneous aggregation. Three pools of ten animals were thereby constituted for both sites of collection (pericardial cavity and muscle). For each pool, the

volume of withdrawn hemolymph was recorded and hemocytes were counted on a Malassez counting chamber in order to determine the total hemocyte count (THC, number of cells per mL). From these data, the total number of collected cells was calculated for each pool.

#### *Flow cytometer analyses*

For each sample, 3 000 events were counted. Data were collected at specific PMT at 500-550 nm for cell mortality (red fluorescence) and 560-670 nm for other parameters (green fluorescence). A FSC threshold was defined in order to eliminate cell debris and bacteria. Hemocyte parameters were monitored using protocols previously described (Gagnaire *et al.*, 2006c).

Cell mortality was quantified using 200  $\mu$ L of hemocyte suspension. Hemocytes were incubated in the dark for 30 minutes at 4°C with 10  $\mu$ L of propidium iodide (PI, 1.0 mg.L<sup>-1</sup>, Interchim).

Phagocytic index was measured *ex vivo* as the proportion of cells that had ingested three or more fluorescent beads. Two hundred  $\mu$ L of hemocyte suspension were incubated for 1 h in the dark at ambient temperature with 10  $\mu$ L of a 1/10 dilution of Fluorospheres<sup>®</sup> carboxylate-modified microspheres (1  $\mu$ m diameter, Interchim). The final ratio beads/hemocytes was 135/1. The hemocyte phagocytic capacity (HPC) was calculated as the mean number of engulfed beads within the phagocytic haemocytes population (Lehmann *et al.*, 2000). Due to technical problems, this parameter was only estimated on data from the Becton Dickinson cytometer.

Production of Reactive Oxygen Species (ROS) was measured using the dihydrorhodamine 123 (DHR123, Molecular Probes), specific of superoxide anion O<sub>2</sub><sup>-</sup>. One  $\mu$ L of a DHR123 solution (145  $\mu$ M) was added to 200  $\mu$ L of hemocyte suspension. Non-specific esterase activity was measured using the non-specific liposoluble substrate fluoresceine diacetate (FDA, Molecular Probes). One  $\mu$ L of a FDA solution (400  $\mu$ M) was added to 200  $\mu$ L of hemocyte suspension. Moreover, dot plots (FL-1 vs. SSC) for hemocytes from both collection sites (pericardial cavity and muscle sinus) were used to discriminate sub populations. Due to technical problems, this analysis was only performed on data from the Becton Dickinson cytometer. Lysosome presence was measured using a commercial kit (LysoTracker<sup>®</sup> Green DND-26, 500  $\mu$ M in DMSO, Molecular Probes). One  $\mu$ L of a LysoTracker aliquot was added to 200  $\mu$ L of hemocyte suspension. Cells were incubated for 30 minutes for esterase activity and ROS production and for 2 hours for lysosome presence. For these three parameters,

incubations were realised in the dark at room temperature and the reaction was stopped on ice (5 minutes).

For esterase activity, ROS production and lysosome presence, gates were defined on the cytograms in order to distinguish different populations according to fluorescence intensity as described before (Gagnaire *et al.*, 2006c).

### *Statistical analyses*

Normality distribution of data was verified with the Kolmogorov-Smirnoff test. In case of abnormality distribution (flow cytometer results), data were transformed into  $\sqrt{\arcsin(\% \text{ positive cells})}$  to meet the normality distribution and ANOVA assumptions. For hemocyte concentration, volume and total of hemocyte counts, values were analysed using a Student test of mean comparison. For flow cytometry results, statistical analysis were realised only on the population of highly stained cells (Gagnaire *et al.*, 2006c). Two-ways ANOVA (collection site and flow cytometer) were carried out using Statgraphics<sup>®</sup> Plus version 5.1 software. In the case of rejection of  $H_0$ , an *a posteriori* LSD (Least Significant Difference) test was used.

## **3. Results**

### *Hemolymph quantity and quality*

THC and total number of collected cells were not significantly higher in the pericardial cavity compared to the muscle (Figure 1). The total volume of hemolymph withdrawn was three times larger in the muscle than in the pericardial cavity ( $p < 0.001$ ) (Figure 1). A microscopical observation of samples showed that muscle hemolymph was less contaminated by gametes and bacteria than pericardial cavity hemolymph (data not shown).

### *Hemocyte mortality*

The number of dead hemocytes was significantly higher using the Beckman Coulter cytometer ( $p < 0.05$ , Figure 2a). No significant differences were reported between pericardial cavity and muscle samples.

### *Phagocytic index*

Phagocytic index was higher for hemocytes collected from the muscle compare to hemocytes collected from the pericardial cavity ( $p < 0.01$ , Figure 2b). However, HPC assessed only with

the FacsCalibur showed no significant differences between the two collection sites ( $p > 0.05$ ) (Figure 3).

The phagocytic index was higher using the Beckman Coulter cytometer ( $p < 0.001$ , Figure 2b, Figure 4). However, the phagocytic index ratio between the two sites of hemocyte collection (pericardial cavity : sinus of the adductor muscle) remained similar (1:2).

#### *ROS production, esterase activity and lysosome presence*

No significant differences were reported between Beckman Coulter and Becton Dickinson cytometers or pericardial cavity and muscle samples for ROS, esterase and lysosome percentages of positive cells (Figure 2c, d and e). However, the dot plots depicted significant differences between pericardial cavity and muscle sinus hemocytes considering R2 (Figure 5).

## **4. Discussion**

The first aim of these experiments was to compare two sites of hemolymph collection used to evaluate hemocyte parameters of *C. gigas*. Hemolymph collection in the sinus of the adductor muscle gave a larger volume less contaminated by gametes and bacteria than puncture in pericardial cavity. However, puncture in the pericardial cavity may take less time to perform than in the sinus of the adductor muscle and could be privileged when processing a high number of oysters while puncture into the muscle should be preserved when large volumes of hemolymph are needed.

The exact origin of bivalve hemocytes remains unknown. However, the origin of hemocytes may be important in immunotoxicological studies (Auffret, 2005). As an illustration, in mouse, permethrin, an insecticide, had different effects on immune cells from blood or from nephros (Prater *et al.*, 2002). Mercury also induces different immunotoxic effects to macrophages or neutrophils (Cunha *et al.*, 2004). Moreover, the heart and particularly the auricles have been described as a major site of bioaccumulation and detoxication of xenobiotics in bivalves (heavy metals; PAHs, PCBs) and of ultrafiltration (Zaroogian et Yevich, 1994; Giamberini *et al.*, 1995). In contamination experiments, hemocytes from pericardial cavity could be more suitable to demonstrate an immunomodulation than hemocytes from the muscle sinus. Thus, one should consider this point when perform immunotoxicological *in vitro* studies.

Using both FCM, the phagocytic index of the whole hemocyte population in the adductor sinus muscle was twice as much as the phagocytic index of the whole hemocyte population of the pericardial cavity. This difference was not due to a depiction of the average number of engulfed beads (HPC) in the two hemocyte populations. Chemicals, as copper, induced changes in hemocyte subpopulation after a few days of *in vivo* exposures (Pipe *et al.*, 1999) granulocytes draw higher phagocytic activities than hyalinocytes in *Crassostrea virginica* (Goedken et De Guise, 2004) or in *Mytilus edulis* (Pipe *et al.*, 1997). Moreover, in the pericardial cavity reside specific hemocytes, serous cells or brown hemocytes which are devote mostly to excretion (Hine, 1999; Ottaviani, 2006). Thus difference in the phagocytic index could here be due to two different patterns of sub populations of hemocytes. FCM analyses showed clearly these two patterns. Consequently, all immunotoxicological studies must now be considered according to the site of collection of hemocytes at least, in *Crassostrea gigas*. Moreover, these two sites with very little connection between them do not exert the same function in bivalves' physiology and the question of the role of the hemocytes in these functions may aroused.

Nevertheless, for a same site of withdrawal, the phagocytic index and cell mortality were higher using the Beckman Coulter cytometer. These differences could be due to the delay (three weeks) between measurements made on the Becton Dickinson cytometer and on the Beckman Coulter cytometer. A survey in Pacific oysters has shown that the phagocytic index of hemocytes collected from the muscle sinus could vary by 8% to 50% during this period of the year (Duchemin *et al.*, 2007). Another explanation could be found in electronic specifications and signal treatment by the FSC photodetector in those cytometers. The Beckman Coulter EPICS XL 4 cytometer translates bead sizes in increasing order (from left to right, increasing size from 3  $\mu\text{m}$  to 8  $\mu\text{m}$ ). The Becton Dickinson FACSCALIBUR cytometer invert bead sizes (from left to right, sizes are 4  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 6  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 8  $\mu\text{m}$  and 7  $\mu\text{m}$ ) (Becker *et al.*, 2001).

ROS, esterase and lysosome percentage of positive cells were not different depending on the cytometer or the sampling method. This result demonstrated the robustness of protocols developed. These activities have been shown to be modulated *in vitro* in contaminated hemocytes compared to controls (Gagnaire *et al.*, 2006c). These results taken together show



the interest of such parameters in immunotoxicological studies.

Phagocytosis measurement using flow cytometry remains the most relevant parameter to assess the status of the immune system in bivalve hemocytes. Since the assay is always performed *ex vivo* (Lehmann *et al.*, 2000), further comparisons could be performed considering the size of the beads and the bead-to-cell ratio following the ingestion of 2  $\mu\text{m}$  (Auffret *et al.*, 2002), 1.7  $\mu\text{m}$  (Bouchard *et al.*, 1999; Xue *et al.*, 2001; Sauve *et al.*, 2002) or 1  $\mu\text{m}$  (Brousseau *et al.*, 2000; Fournier *et al.*, 2002; Gagnaire *et al.*, 2006c) fluorescent beads or labelled bacteria (Allam *et al.*, 2001).

## **5. Conclusion**

This study has shown that hemocyte populations differ regarding the site of collection, opening new perspectives for hemocytes studies. It has also reinforced the benefits of utilizing flow cytometry to study bivalve hemocyte parameters. But these results have finally light up the need for harmonization or standardization of bivalve immune endpoints assessment methods.

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank Pr Michel Fournier for his comments and advices. This research was partly supported by the Poitou-Charentes Region.

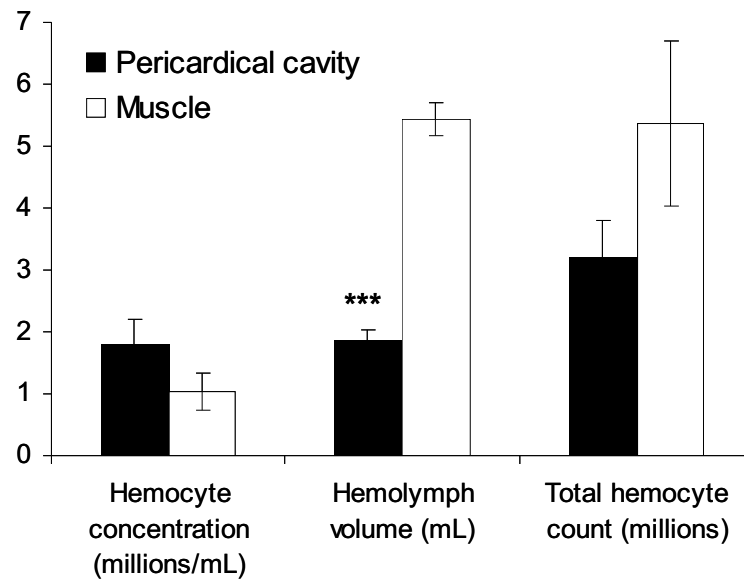


Figure 1.1 : THC, hemolymph volume and total number of cells for pericardial cavity and muscle samples. N= 6 replicates; standard error is presented. \*\*\*:  $p<0.001$ .

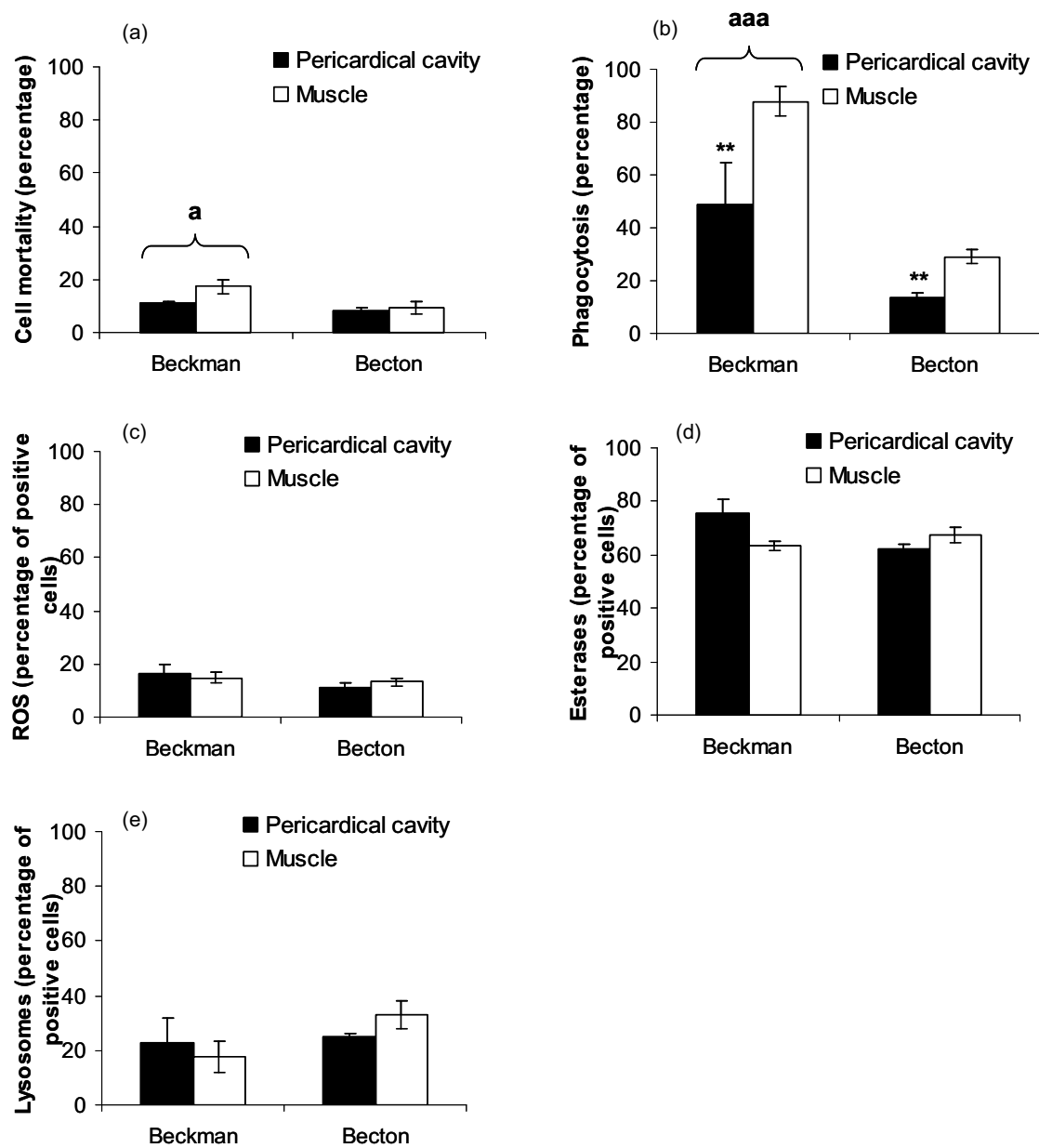


Figure 1.2 : hemocyte activities monitored on both flow cytometers (Beckman and Becton) and both collection sites (pericardial cavity and muscle samples): hemocyte mortality (a), phagocytic index (b), percentage of ROS positive cells (c), percentage of esterase positive cells (d) and percentage of lysosome positive cells (e). N = 3 replicates; standard error is presented. \* represents a significant difference between pericardial cavity and muscle hemocytes. \*\*:  $p < 0.01$ . a represents a significant difference between Beckman and Becton flow cytometers. a:  $p < 0.05$ ; aaa:  $p < 0.001$

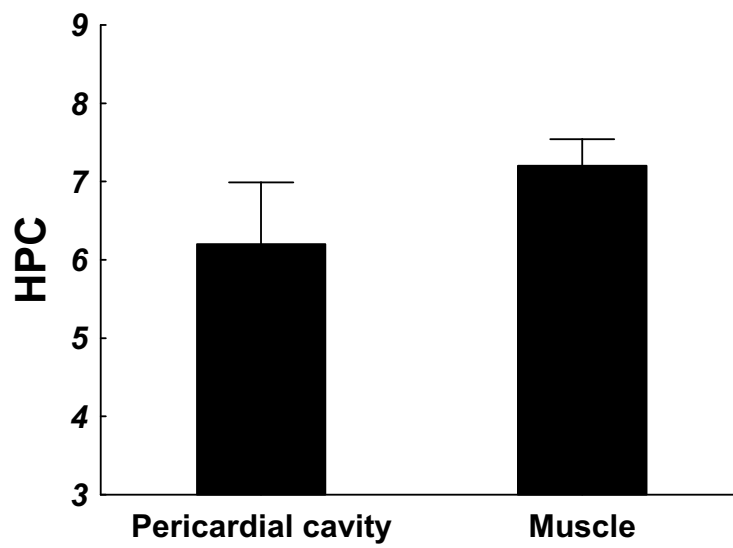


Figure 1.3 : hemocyte phagocytic capacity (HPC) of hemocytes sampled from the pericardial cavity and the adductor muscle sinus. These data have only been collected with the FacsCalibur®.

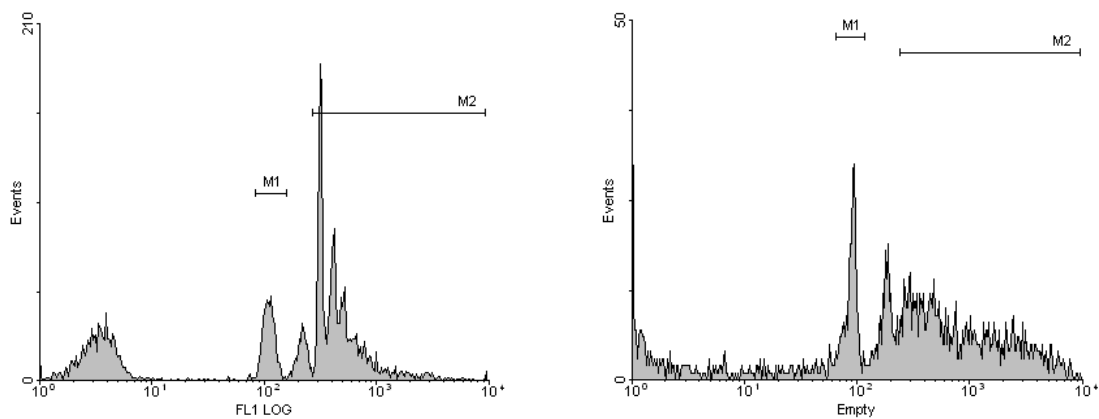


Figure 1.4 : histogram of fluorescence of ingested latex beads obtained with the EPICS XL4® cytometer (left) and the FacsCalibur® cytometer (right) showing the number of hemocytes having engulfed three beads and more (M2). M1 is the marker used for the calculation of HPC.

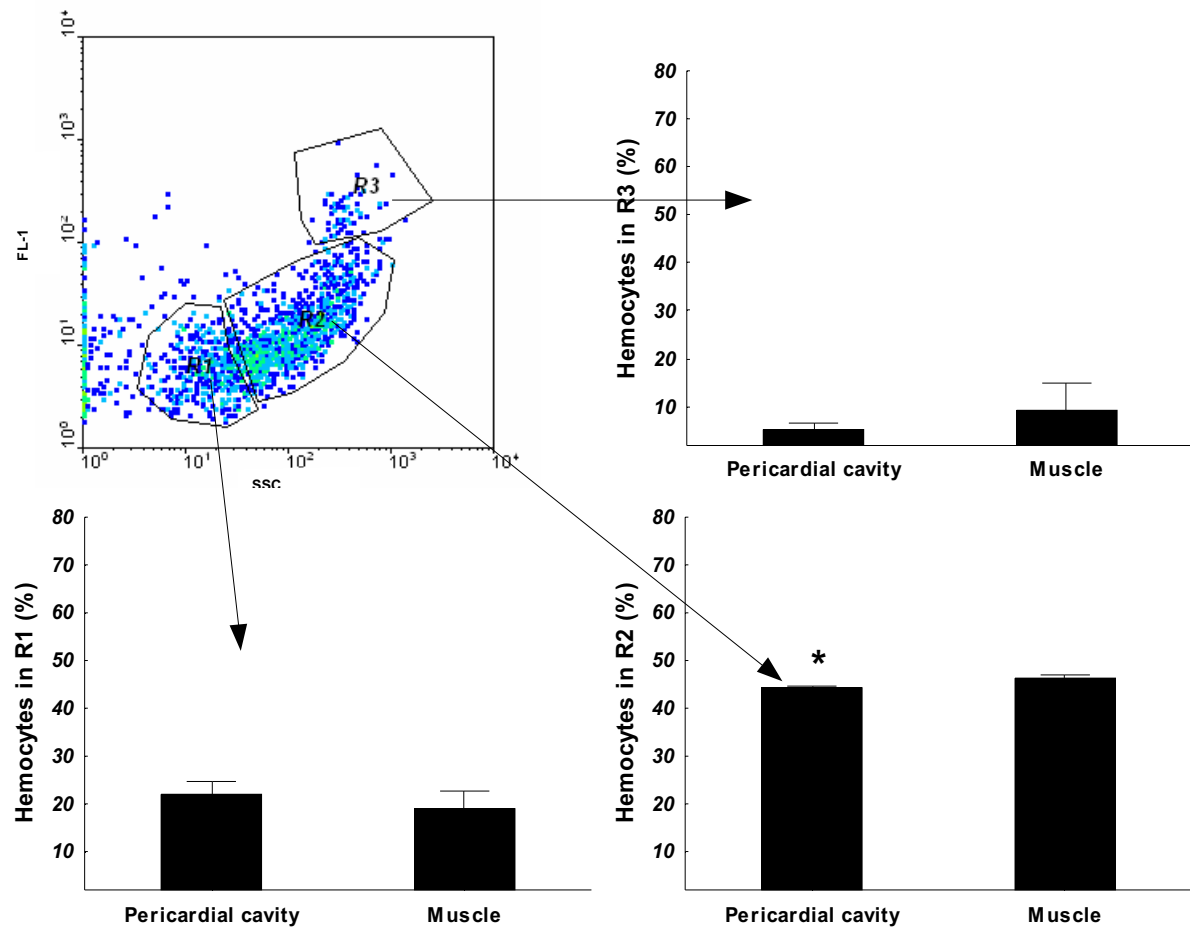



Figure 1.5 : Sub populations' pattern of hemocytes (R1, R2, and R3) in the pericardial cavity or in the adductor muscle sinus discriminated with fluoresceine diacetate (FDA) measured on the FL-1 and scatter light (SSC).

### **III. Études d'harmonisation des méthodes d'analyse des paramètres immunitaires**

## **Assessing immune endpoints in aquatic bivalves: results of first harmonization studies**

Article en préparation

Matthieu Duchemin<sup>1, 2, </sup>, Eckerhard Unruh<sup>3</sup>, Marlène Fortier<sup>2</sup>, Sophie Gauthier-Clerc<sup>4</sup>, Philippe Soudant<sup>1</sup>, Christophe Lambert<sup>1</sup>, Amagoia Gómez Mendikute<sup>5</sup>, Richard Pipe<sup>6</sup>, Miren Cajaraville<sup>5</sup>, Michel Auffret<sup>1</sup>, Michel Fournier<sup>2, 7</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire des sciences de l'environnement marin, UMR CNRS 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, place Nicolas Copernic, 29 280 Plouzane – France

<sup>2</sup> INRS-Institut Armand-Frappier, 245 Hymus, Pointe-Claire, 9R 1G6, Quebec – Canada


<sup>3</sup> Technische Universität Berlin, FB7-Institute for Ecological Research and Technology, Department of Ecotoxicology – Germany

<sup>4</sup> Centre Aquacole Marin de Grande-Rivière, 6 rue du parc, C.P. 340, Grande-Rivière, G0C 1V0, Québec – Canada

<sup>5</sup> Laboratory of Cell Biology and Histology, Department of Zoology and Cell Biology, University of the Basque Country, P.O BOX 644, E-48080 Bilbao, Basque Country – Spain

<sup>6</sup> The Marine Biological Association, Citadel Hill, PL1 2PB, Plymouth – United Kingdom

<sup>7</sup> Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 310 Allée des Ursulines, Rimouski, G5L 3A1, Québec – Canada

 tel.: +33(0)298498677 fax: +33(0)298498645 email: [matthieu.duchemin@univ-brest.fr](mailto:matthieu.duchemin@univ-brest.fr)

**Abstract**

In aquatic ecosystems, the immune system of bivalves has been largely investigated for ecophysiological, ecotoxicological studies or monitoring programmes. Nowadays, different methods and instrumentals are used to assess various immune endpoints. Among them, total haemocyte counts, haemocyte mortality and phagocytosis are widely used. The purpose of this paper is to present results from recent harmonization studies featured by an international group of users of these methods. Three trials have been performed. “PhagoBIM” was devoted to assess the diagnosis ability of three different flow cytometry (FCM) and one microplate reader (MPR) methods following a unique mercury chloride in vitro challenge of haemocytes. “PhagoBIM at home” repeated “PhagoBIM” but each method was performed at home by each participating laboratory. The use of mercury chloride as a chemical reference authorized the comparison of methods. Finally, a comparison of microscope, Facscalibur®, Guava® and Z1Counter techniques to assess total haemocyte counts and haemocyte mortality was performed. FCM and MPR techniques were able to monitor chemical challenge. Nevertheless the utilization of a negative control of phagocytosis and microplate reader techniques appeared to be less reproducible methods. Differences of the use of labelled targets for phagocytosis assessment are discussed. Finally, all techniques were found equivalent for cell counting but FCM techniques offer more information to be integrated in multiparametric analyses.



## 1. Introduction

In aquatic ecosystems, due to their high capacity to filter the water column and though to challenge physical, chemical and biological disturbances and due to their economic value, the immune system of bivalves has been largely investigated as a tool for discriminating different polluted sites in monitoring programs, as an aim of chemicals in ecotoxicological studies or as a physiological response in ecophysiological studies. Among all the immune endpoints, the phagocytosis, the major defence line of bivalves (Cheng, 1981; Fisher, 1988; Galloway et Depledge, 2001), total haemocyte counts (THC) and haemocyte mortality are the most commonly used parameters. Yet, due to laboratory equipments, history or background, different methods to assess them in bivalves currently exist. Nevertheless, from a sample of withdrawn haemolymph, THC is still measured by cells counting but may differ from the instrumental used. Haemocytes mortality is still assessed by the addition of trypan blue or propidium iodide, both colored chemical which enters only dead cells (Cajaraville *et al.*, 1996a; Brousseau *et al.*, 1998). Finally the phagocytic index is still measured by the relative number of haemocytes that have engulfed through microplate reader using bacteria (Pipe *et al.*, 1995a), zymosan (Gomez-Mendikute *et al.*, 2002; Aarab *et al.*, 2006) or through flow cytometry using latex beads (Brousseau *et al.*, 2000; Delaporte *et al.*, 2003; Auffret *et al.*, 2004). Considering one technique, differences deal with time and temperature of incubation, the calculation of the parameter assessing phagocytosis, preserving the haemocytes prior to measurement, the use or not of a negative control, and the instrument used. All these differences may be factors of diverging results for phagocytosis assays (Lehmann *et al.*, 2000) as well as for THC and haemocyte mortality. It is therefore of great concern to face every of the former methods.

In vertebrates, the immunotoxicity of mercury (Bernier *et al.*, 1995a; Moszczynski, 1997; Kazantzis, 2002) is well known (IPCS, 1976, 1991) and has been used for immunotoxicological tools intercalibration within the Canadian Collaborative Immunotoxicity Study and the International Collaborative Immunotoxicity Study programmes (Brousseau *et al.*, 2005). The occurrence of this metal in aquatic ecosystems (Boudou et Ribeyre, 1997; Horvat *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 2002; Booth et Zeller, 2005; Campbell *et al.*, 2005; Lockhart *et al.*, 2005) is of concern and its immunotoxic effects has also been investigated in bivalves (Brousseau *et al.*, 2000; Fournier *et al.*, 2000a; Nieto-Fernandez *et al.*, 2000; Fournier *et al.*, 2001; Sauve *et al.*, 2002; Marchi *et al.*, 2004) and in other aquatic species (Fournier *et al.*, 2000a; Kehrig *et al.*, 2001; Sweet et Zelikoff, 2001; Pillet *et al.*,

2002).

In bivalves a transatlantic collaborative task force has been raised to investigate the harmonization, the calibration and the standardisation of the assessment of immune endpoints in bivalves. This task force has first met in Brest, in 2004, during the “PhagoBIM” workshop, focusing on the assay of phagocytosis. The year after, this task force has met again in Quebec city for the comparison and harmonization of THC and haemocyte mortality endpoints. “HarmaBIM”.

The purpose of the paper was therefore to present results and conclusions of those two workshops.

## 2. Materials and method

### 2.1. Techniques to assess phagocytosis

#### 2.1.1. Phagocytosis assay using flow cytometry: FCM 1 and FCM 1 mod

For the first method, a 100  $\mu$ L sub-sample of haemolymph, primarily diluted with 100 mL of filtered sterilised seawater was brought into contact with 30 mL of the working solution of fluorescent beads in Eppendorf® tubes. Another equivalent tube was prepared with cytochalasine B (CK), an inhibitor of phagocytic activity, at the final concentration of 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Then, after 60 min of incubation at 18°C, haemocytes were fixed with a 6% formalin solution and analysed by flow cytometry (FL1). The paired tubes, with or without CK, were run one after the other. The percentage of fluorescent cells in the tube without CK is attributable to phagocytosis or adhesion whereas the percentage of fluorescent cells in the tube with CK corresponds to adhesion but not to phagocytosis. Phagocytic index was thus calculated as the difference in percentage between these paired tubes.

For FCM 1 mod, CK tubes were not taken into account.

#### 2.1.2. Phagocytosis assay using flow cytometry: FCM 2

FCM 2 followed the protocol of Brousseau et al. (1998). Briefly, 2  $\mu$ m latex beads were added to 1 mL of hemolymph and then incubated at 20 °C for 18 h. After incubation, the cell solution was deposited on a saline buffer BSA 4.5% solution and centrifuged at 300 g for 10 min. Cells were finally transfer to 500  $\mu$ L of saline buffer before being read on a FacsCalibur® (Becton-Dickinson). The phagocytic index was the relative number of haemocytes that has engulfed at least 1 bead calculated from the FL-1 (green) PMT with CellQuest ® (Becton-Dickinson) software.

### *2.1.3. Phagocytosis assay using flow cytometry: FCM 3*

FCM 3 followed the technique described by Auffret et al. (2004), a protocol slightly modified from Brousseau et al. (1998). In summary, a hundred microlitre of each individual hemolymph was deposited into the well of a 96-well microplate. Haemocytes were put then into contact with a solution of 2  $\mu\text{m}$  fluorescent latex beads (Polysciences®, GmbH) according to a bead:haemocyte ratio of 30:1. After gentle centrifugation (4 °C, 300 g, 10 min.), the microplate was incubated for 4 h at 15 °C in the dark. To detach the cells from the well walls, HAAS complemented with trypsin (0.5  $\text{g.L}^{-1}$ ) was finally added and the microplate was agitated for 5 min. The content of each well was then transferred into cytometry tubes before flow cytometry analysis (FacsCalibur®, Becton-Dickinson). The phagocytic index was the relative number of haemocytes that has engulfed at least 3 beads calculated from the FL-1 (green) PMT with CellQuest ® (Becton-Dickinson) software.

### *2.1.4. Phagocytosis assay using microplate reader: MPR 1*

The hemocytes are transferred as 100  $\mu\text{l}$  subsamples directly into the wells of a microtestplate (Greiner, Germany: 655101) for sedimentation and attaching. Out of eight wells, five are used for measuring phagocytosis and three are used to measure the amount of cells via Bradford protein assay. After half an hour the test is started via adding of 25  $\mu\text{l}$  of FITC (Sigma Aldrich, F-3651, Germany) stained Yeast (Dr. Oetker, Germany) cells. Wells for measuring Protein don't get any yeast nor staining. For adjusting FITC-Yeast cells and Trypan Blue to working concentrations a Tris/HCl Buffer is used ( $[\text{Tris-HCl}] = 40 \text{ mM}$ ;  $[\text{NaCl}] = 400 \text{ mM}$ ;  $[\text{CaCl}_2] = 890 \text{ mosmol}$ ;  $\text{pH} = 7.2$ ). The yeast concentration is adjusted between 10:1 and 25:1 depending on the number of hemocytes. Two more wells filled with each used yeast concentration but without Hemocytes are serving as blanks. The plates are covered with film and are incubated for 90 minutes in the dark and at room temperature. With addition of 0.6  $\text{mg.mL}^{-1}$  of Trypan Blue (Sigma Aldrich, Germany) the fluorescence of the not phagocytosed yeast cells is quenched for 20 minutes. After removing all of the supernatant the fluorescence of phagocytosed yeast cells is measured in a Fluorescence Microplate reader (Dynatech Fluorolite 1000 at Exc. 485 nm and Em. 535 nm. Due to the different concentrations of yeast cells each hemocyte sample needs to have its own yeast blank. The total amount of engulfed yeasts was calculated as Relative Fluorescence Units

(RFU):  $RFU = \text{Fluorescence of Sample} - \text{Fluorescence of Control}$ . The hemocytes for the protein assay are fixed with methanol and stored until measurement. Prior to protein determination, the methanol needs to be removed. Lysation of the cell is done mechanically with 50  $\mu\text{l}$  of 0.1 M sodiumhydroxide (Merk, Germany). Subsamples of 10  $\mu\text{l}$  and aliquots of a BSA (Sigma Aldrich A-2153, Germany) standard are mixed with 200  $\mu\text{l}$  of Bradfords reagent (Coomassie Blue brilliant Blue G450) with the BioRad (500-0006) as 20 % dilution in Aqua bidest. The Optical Density is measured at 620 nm with a microplate ELISA reader. Protein concentration is calculated from the BSA standard curve. The phagocytic index was calculated as:  $PI = RFU / \mu\text{g Protein}$ .

#### 2.1.5. Phagocytosis assay using microplate reader: MPR 2

*Miren or Amagoia please insert the corresponding method here.*

#### 2.2. Mercury chloride preparation

Eight solutions ( $10^{-3}\text{M}$ ,  $10^{-4}\text{M}$ ,  $10^{-5}\text{M}$ ,  $10^{-6}\text{M}$ ,  $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-8}\text{M}$ , and  $10^{-9}\text{M}$ ) of mercury chloride (Sigma-Aldrich, M1136) were prepared from a working solution of  $10^{-2}\text{M}$  of mercury chloride in distilled water. Nine hundred microliters of haemolymph was distributed into 5 mL Falcon® tubes and exposed to 100  $\mu\text{L}$  of the different mercury chloride solutions. A ninth tube was filled with 100  $\mu\text{L}$  of distilled water as the control (CTR). Final volume was 1000  $\mu\text{L}$ .

#### 2.3. PhagoBIM

Mussels (45 mm – 55 mm), *Mytilus edulis*, was received from a producer (Salardaine, Le Vivier-sur-Mer, France) six days prior to the workshop. On arrival there were kept in filtered circulating seawater tank and daily fed with T-iso. Haemolymph from ten individuals was pooled into a 15 mL falcon® tube and stored on ice before acute mercury exposure. Haemolymph was then divided into fourteen tubes and exposed to the eight mercury doses and control for 3 h in the dark at 15°C. A blind test appeared to be the more suitable experimental design to objectively diagnosis a mercury chloride exposure. The observer did not know what concentration of mercury chloride he was assessing but one, a control tube known as tube #1. Some concentrations were in replicates in order to study the reproducibility of the assay (table 1). Participants were acknowledged to present and order their data as

relative values to the value of tube #1. Then, the concentration of mercury chloride of each tube was divulged.

#### *2.4. PhagoBIM at home: interlaboratory comparison of phagocytosis*

A second trial was set up in July 2004 in order to compare phagocytosis assays while participants were in their own laboratory environment. “PhagoBIM at home” repeated PhagoBIM, performing *in vitro* exposures of a pool of haemolymph of ten mussels with eight doses plus control. Mussels were collected locally.

#### *2.5. Trial #3: Comparison of four total haemocyte counts (THC) and three haemocyte mortality methods*

For the comparison of THC and haemocyte mortality assays, mussels were collected at Metis beach (Québec) in January 2007. In each trial, haemolymph of each individual was collected from the anterior adductor muscle with a new 1 mL or 2 mL syringe. Twenty mussels were sample for this trial. THC was assessed as the number of haemocytes in the sampled haemolymph and haemocyte mortality as the relative number of dead cells in the hemolymph. For each individual, THC and haemocyte mortality was measured as follows. According to Brousseau (1998), cells were counted in counting chambers (Malassez) under an optical microscope at 250X with a drop of Trypan blue, which enters only dead cells. The number of counted cells was THC and the number of blue-colored cells, haemocyte mortality. Flow rate of Facscalibur® was checked with calibrated beads (Calibrite®, Becton-Dickinson) to allow absolute counting, while Guava® was designed to cell counting. Haemocyte mortality was assessed by adding propidium iodide to the haemolymph of each sample. Propidium iodide enters only dead cells and fluoresces in the red when excited by the LASER of the two former cytometers. Finally a Z1 Counter (Coulter) was used to assess only THC.

## 2.6. Data management

For the “PhagoBIM” trial, each value was then calculated relatively to the control value of tube #1. A mean square adjustment was processed for all the points of each method. For the “PhagoBIM at home” trial, each value was calculated relatively to the control (CTR). For trial #3, the normality of the distribution was tested with the Kolmogorov-Smirnoff test, and Pearson’s correlation coefficient was tested at  $p < 0.05$  (Sokal et Rohlf, 1995). All statistics were performed with Statistica v7.1 (Statsoft, France).

## 3. Results

### 3.1. PhagoBIM

All FCMs’ dose-response curves have the same shape, but FCM 1: a plateau of phagocytosis between CTR and  $10^{-6}$ M followed by a dramatic loss of phagocytosis between  $10^{-5}$ M and  $10^{-3}$ M (Fig 20). This decrease of phagocytosis was more progressive and nearly linear for FCM 1 mod. Dispersion of CTR,  $10^{-6}$ M,  $10^{-5}$ M, and  $10^{-4}$ M was reduced when assessing phagocytosis with FCMs’ methods but FCM 1. The MPR curve showed a slight stimulation of phagocytosis and then a progressive decrease from  $10^{-6}$ M to  $10^{-3}$ M (Figure 1.6). Dispersion was high (nearly 80 % from tube#1 for CTR values) with this assessing method of phagocytosis.

### 3.2. PhagoBIM at home

Once repeating the in vitro exposure under the same conditions but in the usual laboratory environment of each method, the dose response curves did not differ from each other during the plateau phase until  $10^{-6}$ M (Figure 1.7). But differences exist during the decreasing phase. While FCM 2 drew 84 % of inhibition of the phagocytosis at  $10^{-5}$ M, the other methods drew only 40 % for FCM 1 mod, 12 % for MPR, and 15 % for FCM 3. The phagocytic index inhibition at  $10^{-3}$ M changes also according to these methods (85 % for FCM 1 mod; 98 % for FCM 2; 70 % for FCM 3, and 47 % for MPR).

### 3.3. Trial #3

The different techniques to measure THC are not equal. Whether the microscope technique is only correlated ( $r = 0.62$ ) with the Z1 Counter, the two flow cytometries techniques are correlated ( $r = 0.73$ ). Finally the THC assay using a Facscalibur® is correlated to the Z1 Counter technique ( $r = 0.57$ ) (Table 2). Considering haemocyte mortality, the

technique utilizing the Guava® is correlated to the microscope's technique ( $r = 0.34$ ) and to the Facscalibur® technique ( $r = 0.21$ ), but the two last techniques are not correlated together at the considered p value (**Table 3**).

## 4. Discussion

### 4.1. Comparison of dose-response curves of the phagocytic index

The main objective of PhagoBIM was to verify whether different methods to assess phagocytosis in bivalves could similarly assess a unique chemical challenge. In this first trial, every methods draw similar results with a two-phase dose-response curve. These curves were similar to those obtained in several bivalves facing mercury chloride challenges (Fournier *et al.*, 2001; Sauve *et al.*, 2002; Gagnaire *et al.*, 2004). Even if this trial was not designed for calibration, it was relevant to face each method performed by its full-trained operator. The MPR method drew poor reproducibility. This apparent weakness of the method could be due to the use of an unusual microplate reader and therefore drove the “PhagoBIM at home” trial. FCM 1 drew huge inter-replicate variations. FCM 1 was thus harmonized with the other flow cytometric methods eluding the negative control. The reproducibility of FCM 1 mod was thereby narrow FCM 2 and FCM 3. The cytochalasine B negative control in FCM 1 was responsible for this dispersion. Whereas cytochalasine B inhibits phagocytosis, it may also interact with mercury chloride or with sub cellular components of haemocytes. The reproducibility of FCM 1 mod, FCM 2 and FCM 3 methods was higher than MPR method for all tested replicates (CTR,  $10^{-6}$ M,  $10^{-5}$ M, and  $10^{-4}$ M). Nevertheless, while FCM 1 was following the same decrease than FCM 2 and FCM 3, we found no hypothesis to the more progressive decrease of phagocytosis with FCM 1 mod.

“PhagoBIM at home” was achieved in order to take into account the factor “laboratory environment”. The dose-responses curves showed the same two phases than during PhagoBIM trial: a plateau followed by a decrease at  $10^{-5}$ M. But the decrease was not the same according to the different methods and to the two mercury chloride challenges (PhagoBIM and PhagoBIM at home). It is unlikely that the mussels sampled for PhagoBIM at home were more resistant at  $10^{-4}$ M and  $10^{-3}$ M than those of PhagoBIM. These concentrations induced 95% of mortality in juvenile mussels (Nelson *et al.*, 1988). Gametogenesis is correlated with immune system variations in *Crassostrea gigas* (Duchemin *et al.*, accepted) and even if PhagoBIM at home had been performed during the same month (July), mussels collected by the different research teams may have not been at the same maturation stages due to the

difference locations of the involved laboratories. But data were related to control tubes which would have eluded that reproduction interaction. Inter-individual variations are high in Bivalves (Galloway et Depledge, 2001) and in a pool of haemolymph extremes express these differences. Finally, the use of cell line could improve this kind of work, but very little has been published on this subject until now (Barcia *et al.*, 1999). (*Maybe Ecke, you could write shortly about your primoculture.*)

#### 4.2. Comparison of the designs of the phagocytosis assays

One of the major differences between the four methods was the labelled targets used. While for FCM methods latex beads were used, the MPR method used yeasts. Thereby, the methods did not assess, *stricto sensu*, the same biological process. Latex beads are biologically neutral whereas yeasts are eukaryote cells and induce opsonization, like zymosan, as a biological-haemocyte interaction in the haemolymph of many bivalves (Canesi *et al.*, 2002). Moreover, engulfed fluorochromes-labelled (especially with FITC) yeasts and zymosan may express different fluorescence depending on intra-haemocyte pH (Lehmann *et al.*, 2000). Conversely, the latex beads, made with the fluorochromes, are pH-dependant. That is also why the mean number of engulfed beads may be calculated with FCM methods while it cannot when using yeast or zymosan. Furthermore, the calculation of the phagocytic index was very easy in FCM methods of FL-1 histograms because peaks of fluorescence appeared for each new engulfed bead excited. This was also true with PC red latex beads, but not with FITC-labelled bacteria (data not shown). Finally, the calculation of the phagocytic index with MPR methods includes more analytical steps.

MPR 1 used trypan blue to quench the suspension media fluorescence due to non-engulfed yeasts. FCM methods only assess the fluorescence of the cells. Therefore a bead adsorbed at the surface of a haemocyte cannot be discriminated from a bead in the haemocyte. FCM 2 used BSA to detach those beads and calculated the phagocytic index as while FCM 3 calculated the phagocytic index as the proportion of haemocytes that had engulfed at least one bead when FCM 3 considered only cells of three or more beads. At least one can envisage that adsorbed beads have entered the first step of the whole phagocytosis process (Galloway et Depledge, 2001).

#### 4.3. Comparison of instruments

The comparison of instruments for assessing phagocytosis is barley difficult because



the number of steps to the data. Differences have been put in light during PhagoBIM. MPR methods are more time consumer than FCM methods, while they are less reproducible and give less information on the cells. But microplate readers remain affordable for nearly every budget and can be easily transportable for field studies. But when studying the immune system, one cannot just focus on an endpoint (Luster *et al.*, 1992; Luster *et al.*, 1993; Germolec, 2004) and FCM methods gain much more in usefulness. When comparing the four methods (two FCM, cell counter and microscope) to assess THC, the calculated coefficients of correlation and their statistical significance promote the idea that none of these techniques are significantly more precise than another. The comparison for haemocyte mortality leads to the same conclusion. To assess THC the Facscalibur® appeared to be as good as the Z1 Counter and the Guava®, two instruments designed to allow absolute cell counting. But the choice of techniques needs to take into account other parameters than scientific purposes. The microscope is costless and easy to transport during field studies. The Z1 Counter is more expensive, transportable, but can be used only for counting. The Facscalibur® is devoted to various cell analyses and cell counting is allowed if flow rate had been checked before, but it is hardly transportable. The Guava® which is designed to allow absolute counts is easily transportable and may also be use to assess numerous cell parameters. We finally think Guava® can conveniently be devoted to field studies once protocols have been set up and standardized with Facscalibur®.

## **5. Conclusion**

In conclusion, the different methods to measure the phagocytic index similar sensitiveness to mercury chloride providing evidence of the robustness of the phagocytic index parameter: apart from largely different methods one can come to the same diagnosis. In FCM methods the addition of a negative control induced lower reproducibility of the method while, taken as a whole they were more reproducible in these trials than MPR methods. Moreover, FCM methods allow assessing other cell parameters and cell counting. Finally, in order to share with other scientists a one and same protocol in field studies, we find FCM 3 as the more suitable for performing assays of large amount of samples, in microplate, within a few hours and with the possibility to fix the cells for further analyses.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank the Réseau en écotoxicologie du Saint Laurent, the

Conseil Général du Finistère, the Région Bretagne, the Université de Bretagne Occidentale, the Institut Européen Universitaire de la Mer, the French-Quebec commission, the Coopération Interuniversitaire Franco-québécois for grants and financial supports to these workshops. The authors also acknowledge Laurent Memery of the Laboratoire des sciences de l'environnement marin and Michel Lagacé from the Nouveau Parc Aquarium de Québec for their logistical help.

Table 1: Number of replicates for the “PhagoBIM” trial

<i>Mercury chloride solution (M)</i>	<i>CTR</i>	<i>10<sup>-9</sup></i>	<i>10<sup>-8</sup></i>	<i>10<sup>-7</sup></i>	<i>10<sup>-6</sup></i>	<i>10<sup>-5</sup></i>	<i>10<sup>-4</sup></i>	<i>10<sup>-3</sup></i>
<i>Number of replicates</i>	4	1	1	1	2	2	2	1

Table 2: Values of r when assessing THC through four methods. Stars (\*) indicate significant correlation at  $p < 0.05$ .

	<i>Microscope</i>	<i>Guava®</i>	<i>Facscalibur®</i>	<i>Z1 Counter</i>
<i>Microscope</i>	1.00	0.23	0.24	0.62*
<i>Guava®</i>	0.23	1.00	0.73*	0.32
<i>Facscalibur®</i>	0.24	0.73*	1.00	0.57*
<i>Z1 Counter</i>	0.62*	0.32	0.57*	1.00

Table 3 : Values of r when assessing haemocyte mortality through three methods. Stars (\*) indicate significant correlation at  $p < 0.05$ .

	<i>Microscope</i>	<i>Guava®</i>	<i>Facscalibur®</i>
<i>Microscope</i>	1.00	0.34*	0.08
<i>Guava®</i>	0.34*	1.00	0.21*
<i>Facscalibur®</i>	0.08	0.21*	1.00

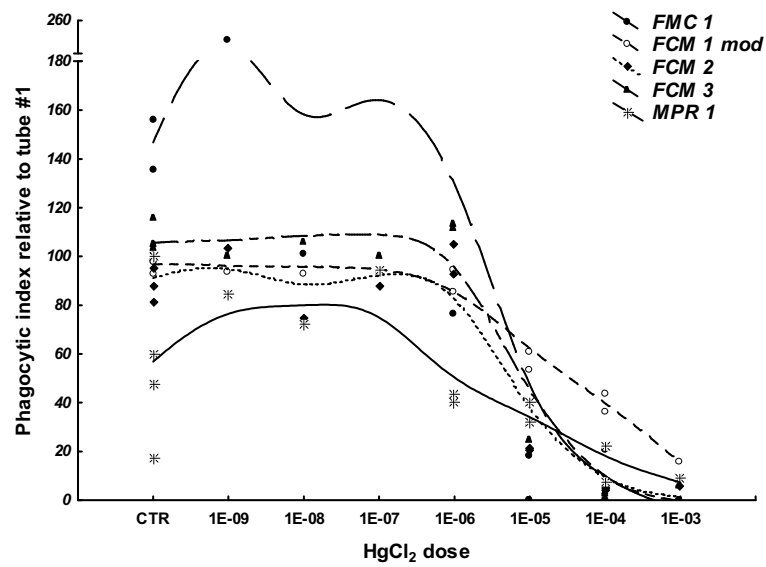


Figure 1.6 : Phagocytic index of haemocytes of *Mytilus edulis* facing a same in vitro mercury challenge through four flow cytometric (FCM 1, FCM 1 mod, FCM 2, and FCM 3) methods and one microplate reader (MPR) method. The curves are the adjustment of the weighed mean squared.

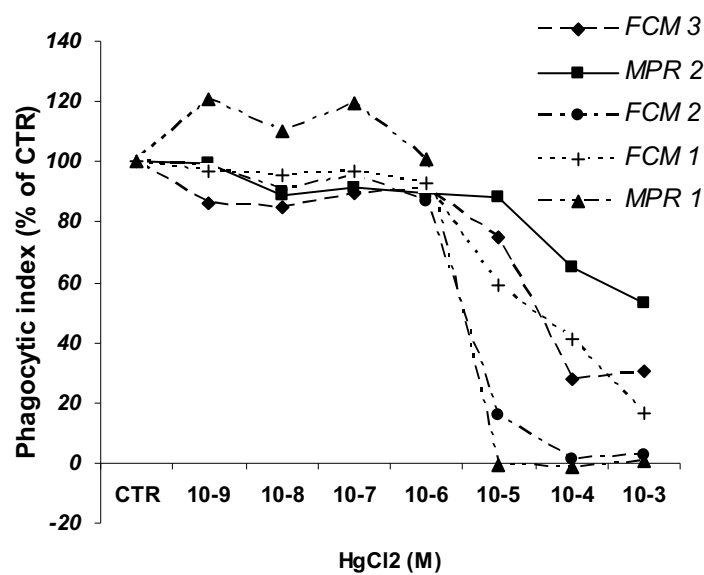


Figure 1.7 : Phagocytic index of haemocytes of *Mytilus edulis* facing in vitro mercury challenges through three flow cytometric (FCM 1 mod, FCM 2, and FCM 3) methods and two microplate reader (MPR1 and MPR 2) methods performed in five different laboratories.

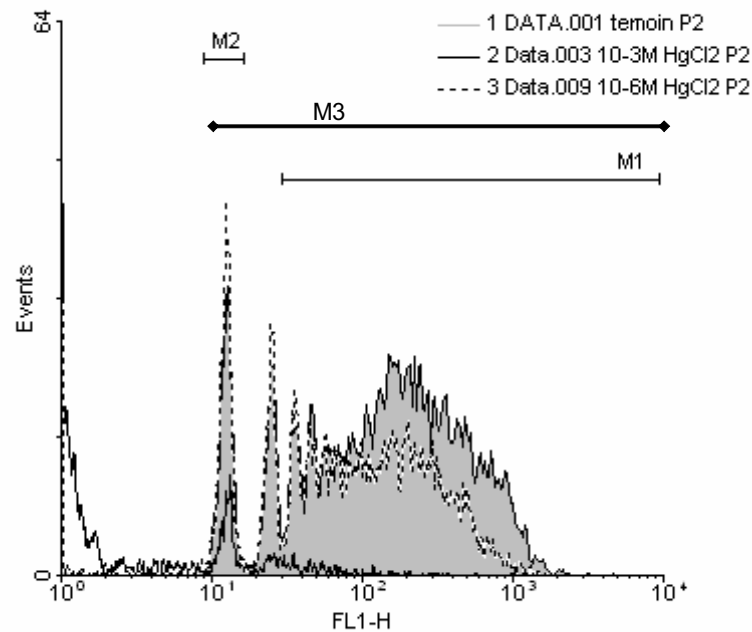


Figure 1.8 : FCM histograms of haemocytes in phagocytosis. M2 and M3 are markers to calculate the phagocytic index of 1 bead and more (M3) or three beads and more (M1). M2 gives the fluorescence of one bead in order to calculate the haemocyte phagocytic capacity. The (-) histogram is obtained from control samples, the (--) histogram from  $10^{-6}$ M of HgCl<sub>2</sub> and the (-) histogram from  $10^{-3}$ M of HgCl<sub>2</sub>.

**IV. Indicateur de la condition physiologique globale d'un individu et développement d'un nouveau protocole d'exposition individuelle**

## **Flow cytometric measurement of the clearance rate in the blue mussel *Mytilus edulis* and the development of a new individual exposure system for aquatic immunotoxicological studies**

Article soumis à Environmental Pollution (ENVPOL-D-07-00039)

Matthieu B. Duchemin<sup>1,2,✉</sup>, Nathalie Wessel<sup>1</sup>, Michel Fournier<sup>2,3</sup>, Michel Auffret<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des sciences de l'environnement marin, UMR CNRS 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, place Nicolas Copernic, 29 280 Plouzane – France

<sup>2</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, 245 Hymus, Pointe-Claire, 9R 1G6, Quebec – Canada

<sup>3</sup> Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 310 Allée des Ursulines, Rimouski, Qc., Canada G5L 3A1

✉ tel.: +33(0)298498677 fax: +33(0)298498645 email: [matthieu.duchemin@univ-brest.fr](mailto:matthieu.duchemin@univ-brest.fr)

### *Abstract*

Animals in bad health condition are not relevant biological models. The current study focused on the use of the clearance rate of *Mytilus edulis* to assess the gross physiological condition of individuals maintained in stressful experimental conditions. This approach was developed in a new, highly controlled exposure experimental device designed to investigate individual responses in aquatic ecotoxicological studies. Both clearance rate values and immune parameters analyse indicated that the health condition of mussels kept in 50 mL tubes for 24 h or 48 h was not altered compared to controls, while most parameters were depressed after 72 h. Moreover, this study confirms the relevance of flow cytometric measurement for the clearance rate compared to techniques utilizing microscope. Current results prompted us to perform further 24 h chemical exposure using this “in tubo” device.

### *Keywords*

Aquatic pollution; individual exposure; clearance rate; *Mytilus edulis*; immune parameters

### *Capsule*

Test-tube mussels offer a new exposure design for immunotoxicology.



## 1. Introduction

It is widely accepted in experimental sciences that an animal in bad health condition is not a relevant biological model. Thereby the use of cellular biomarkers to study toxic effects of chemicals requires information on the gross physiological conditions of contaminated individuals. Bivalves are filter feeders and are therefore inclined to accumulate dissolved toxicants or particle- adsorbed toxicants when filtering the water column (Shumway *et al.*, 1985; Page et Widdows, 1991; Sobral et Widdows, 1997; Denis *et al.*, 1999). Due to this ecological feature and to its geographical distribution, the blue mussel *Mytilus edulis* has been used as a model for many marine ecotoxicological studies in Mediterranean border and all North-Atlantic coasts and (Auffret, 2005). In bivalve molluscs, the clearance rate, defined as the volume of water cleared from suspended particles per unit of time (Riisgård, 2001), is naturally related to condition index, scope for growth (Denis *et al.*, 1999; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2001a; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2001b) and response to chemical stress (Smaal *et al.*, 1991; Blackmore et Wang, 2003). Thus it represents a good non invasive endpoint of the gross physiological condition and it can be assessed through direct or indirect methods (Riisgård, 2001; Petersen *et al.*, 2004).

Flow cytometry is mainly devoted to cell analysis and is much used in immunology of vertebrates and invertebrates, especially in bivalves (Auffret, 2005) and in phytoplankton research, using the natural fluorescence of phytopigments under the blue LASER excitation (Phinney et Cucci, 1989; Platt, 1989; Toepel *et al.*, 2004; Rutten *et al.*, 2005; Bouman *et al.*, 2006).

To allow the measurement of the clearance rate of individuals under standardised conditions, an original protocol keeping mussels in small volume units – i.e. 50 mL polypropylene tubes – was developed. These artificial conditions were supposed a priori to be stressful for the mussels since those molluscs usually filter up to 3 L.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> of water (Riisgård *et al.*, 2003). The current study aimed to provide a new exposure regime for immunotoxicological studies in mussels with the addition of an endpoint devoted to the assessment of the gross physiological condition of individuals.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Animal husbandry

For all trials, mussels, *Mytilus edulis*, (45 mm – 50 mm) were collected on the natural rocky bed of the Pointe du Diable (Plouzane, France) and were acclimated in open water

tanks, fed continuously with Isochrysis (T-iso strain). This strain is commonly used for bivalve feeding and has been grown through standardized procedures and optimized culture media for many years in our laboratory.

### *2.2 Trial #1: Clearance rate endpoint's development*

Trial #1 focused on the development of the use of the clearance rate to assess the gross physiological condition of constrained mussels. Five mussels were immersed individually in 50 mL Falcon® tubes filled each with 30 mL of four algal suspensions ( $2.4 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$ ,  $1.6 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$ ,  $0.8 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$  and  $0.4 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$ ). These concentrations were obtained from serial dilutions into filtered seawater. Algal concentration was assessed after 0 min, 10 min, 20 min and 40 min and the seawater temperature during this trial was 15°C. The clearance rate was measured with an indirect method of assessing the initial and final concentration of an algal solution (Riisgård, 2001) according to classical algal cell counting (Utermöhl, 1958). Briefly, 100 µL of Lugol's solution ( $\text{I}_2$ , 5%; KI 10%, seawater) was added to 900 µL of the sampled solution. Iode ( $\text{I}_2$ ) colours and makes the algal cells heavier to help sedimentation and counting. Cell counting was performed under microscope using a Malassez counting chamber at 250X.

### *2.3 Trial #2: Temporal changes of the clearance rate and immune parameters*

Trial #2 focused on temporal changes of the clearance rate and on immune parameters while mussels were kept in 50 mL tubes. Mussels were placed individually in 50 mL Falcon® tubes filled with 30 mL of filtered seawater. The tubes were placed in a temperature-controlled room at 15°C, the local ambient temperature of seawater at that time of the year (July) and temperature in the tube filled with cleared seawater was checked throughout the experiment. After 0 h, 24 h, 48 h and 72 h, 30 mL of a solution of  $1.6 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$  of T-iso replaced the seawater. The clearance rate of five mussels per group was then measured as described above. Haemolymph was then immediately withdrawn from the adductor muscle to assess haemocyte mortality, and phagocytic index with a flow cytometer (FacsCalibur®, Becton-Dickinson) and CellQuest® software (Becton-Dickinson) as described in Auffret et al. (2006).

### *2.4 Trial #3: Methods comparison for algal cells counting*

To compare cell counting with a microscope *versus* flow cytometer (FacsCalibur®),

three serial dilutions of a  $1.6 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup> algae's solution in filtered seawater (1/2, 1/4, 1/8) were used. Algal concentration was then measured with the microscope as formerly described and algal cells were plotted with CellQuest® software according to their size and their red fluorescence with a controlled-flow cytometer.

### 2.5 Data analysis

Data analysis was performed with Statistica v7.1 (Statsoft, France). Normality was tested by the Kolmogorov-Smirnoff's test and ANOVA was performed in order to test the effect on immune parameters of mussels' passed time in tubes (Sokal et Rohlf, 1995).

## 3. Results and discussion

In the first trial, algal concentration decreased linearly during the very first minutes of incubation. Seawater was cleared from 90 % of algae within 20 min when initial concentrations were above  $0.8 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>. Below that concentration, more than 90 % of cells were cleared within 10 min (Fig 25). In the second trial, immediately after being placed in tubes mussel cleared only 30 % of algae within 20 min. But while after 24 h and 48 h mussels in tubes removed 90% of algae, 72 h mussels cleared only 10 % (Fig 26). This experimental design did not affect the haemocyte mortality up to 72h but the phagocytic index of the mussels decreased significantly after 72 h last in the tubes (Fig 27). Finally, a very strong correlation ( $r^2 = 0.9991$ ,  $p = 0.005$ ) was calculated when comparing the two counting techniques in the third trial.

Data obtained from the first trial indicate that 20 min was the optimal lap of time for clearance rate assessment under these conditions. This observation is in accordance with the time of maximum filtration activity measured with the clearance method in mussels of similar size but in low algal condition at 10°C and mussels were fed with *Rhodomonas sp.* (Riisgård et al., 2003). Above this time, mussels regulate their siphon opening depending on algae concentration. Visual observations of mussels showed also that a high clearance rate was related to valve opening immediately after contact with algae, the mantle being well spread out the shell. This behaviour is in accordance with the feeding phase I presented by Riisgård (2003). During the second experiment, control mussels happened to have a lower clearance rate than the other mussels. Since environmental stress has been reported to affect clearance rate (Smaal et al., 1991), we assumed that control mussels were stressed immediately after being immersed into the tubes. This hypothesis was supported by observations that, after 24h

lasted in tubes, the clearance rate of mussels returned to similar values to the first experiment. This artefact prompted us to further adapt the protocol by letting the mussels undisturbed in the experimental tubes 2h prior to any other treatment. Moreover, a major result of this trial was that the filtering physiology of mussels in tubes was not affected by these experimental conditions within 48 h, while it was after 72 h. Considering the reduced volume of water available, the question of respiration aroused naturally. The tubes were not equipped with air bubbling since preliminary trials had revealed that it could more disturb the individuals than offer better conditions. Furthermore, water renewal did not appear to change the clearance rate (data not shown). When immune parameters were monitored, a seventy-two hour period in tube significantly impaired the phagocytic index of mussels. Unchanged rates of cell mortality indicated that no acute cytotoxic effects were induced. After 48 h phagocytic index values showed an increased standard deviation, revealing a more heterogeneous response among individuals. We assumed this observation was not related to size heterogeneity of the sampled mussels according to our material. At the opposite of variations of the clearance rate, phagocytosis was not altered immediately after immersion in tube. Indeed, valve closure may respond immediately to an external stress (Denis *et al.*, 1999; Blackmore et Wang, 2003; Riisgård *et al.*, 2003). Conversely, physiological changes affecting internal organs are likely to occur after homeostasis has been disrupted. This is confirmed by previous observations in *Mya arenaria* of decreased phagocytosis after several days of in vivo exposures to mercury (Fournier *et al.*, 2001). Finally, when different algae were compared in trial # 3, T-iso strain was easily discriminated with flow cytometry due to the red fluorescence of chlorophyll. The strong correlation of the two counting techniques gave evidence of the relevance of using flow cytometry in clearance rate measurement compared to microscope counting. Due to the natural fluorescence of the phytopigments, paraformaldehyde without Iode addition may be recommended for preserving algae before counting.

In conclusion, the new experimental design, called here “in tube”, may be adapted for sub acute exposure (24 h) of mussels to chemicals, after a short acclimation period. This study was designed for further immunotoxicological investigations but in tube experiments may also be worthwhile for other research schedules.

### Acknowledgements

The authors wish to gratefully thank Alain Marhic for technical support with algae culture. Contribution N°XXXX of the IUEM, European Institute for Marine Studies (Brest, France).

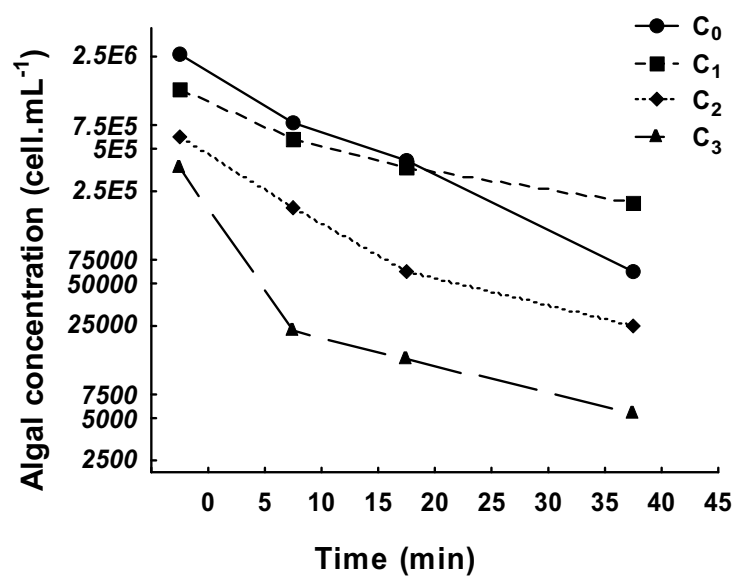


Figure 1.9 : Algal reduction of 30 mL of four different initial concentrations of T-iso in tubes filled in each with a mussel and measured with a cell counting chamber (Malassez). Each point is the mean of algal concentration of five tubes.

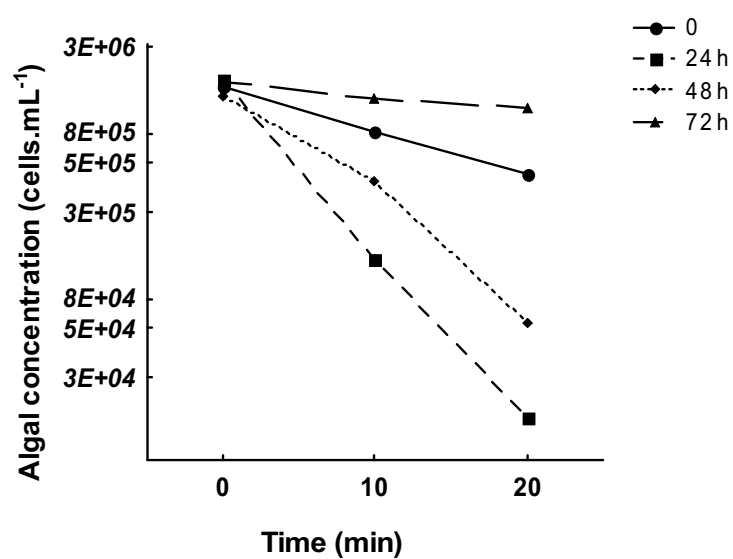


Figure 1.10 : Algal reduction measured with a cell counting chamber (Malassez) for different time of incubation in tubes filled in each with a mussel. Each point is the mean of algal concentration of five mussels fed with 30 mL of T-iso.

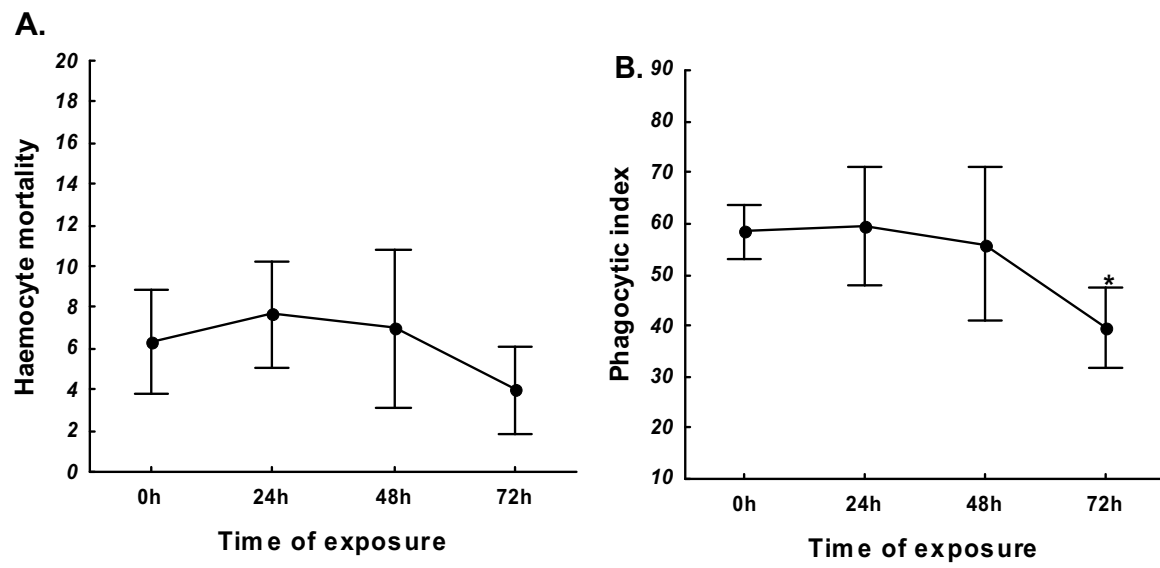



Figure 1.11 : Haemocyte mortality (A.) and phagocytic index (B.) of mussels (5 per group) after different times of incubation in tubes. The bars are the standard deviation and the star (\*) indicates significant differences at  $p < 0.1$ .

**V. Application du nouveau protocole d'exposition « in tubo » :  
approche comparative d'une exposition au chlorure de  
mercure**



## **Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through in vivo, in tubo and in vitro exposures**


Article soumis à Environmental Pollution (ENVPOL-D-07-00041)

Matthieu B. Duchemin<sup>1, 2, </sup>, Michel Auffret<sup>1</sup>, Nathalie Wessel<sup>1</sup>, Marlène Fortier<sup>2</sup>, Yves Morin<sup>2</sup>, Jocelyne Pellerin<sup>3</sup>, Michel Fournier<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des sciences de l'environnement marin, UMR CNRS 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, place Nicolas Copernic, 29 280 Plouzane – France

<sup>2</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, 245 Hymus, Pointe-Claire, H9R 1G6, Quebec – Canada

<sup>3</sup>Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 310 Allée des Ursulines, Rimouski, G5L 3A1, Quebec – Canada

 tel.: +33(0)298498677 fax: +33(0)298498645 email : [matthieu.duchemin@univ-brest.fr](mailto:matthieu.duchemin@univ-brest.fr)

### *Abstract*

Biological impairments due to mercury discharge into the environment are now an issue of global concern. From the three forms of mercury found in aquatic ecosystems, the immunotoxic effects of mercury chloride was examined in the model animal, the blue mussel. In order to investigate the toxic potency of this chemical, three exposure regimes were carried out: chronic exposure of groups of individuals, a new protocol “in tubo” designed for sub acute exposures of individuals, and acute exposures of target cells. The clearance rate was also measured under the “in tubo” scheme to warrant the good physiological condition of mussels. Chronic exposure revealed significant immunotoxic effects after 7 days at  $10^{-6}\text{M}$ , while acute exposures showed significant inhibition of phagocytosis at  $10^{-4}\text{M}$  and  $10^{-3}\text{M}$ . In sub acute exposures both circulating haemocytes and haemocyte mortality increased at  $10^{-4}\text{M}$  and  $10^{-3}\text{M}$  while phagocytosis and the clearance rate drew hormetic toxic effects. These results suggest the depiction of new perspectives for bivalve toxicological studies using the “in tubo” design.

### *Keywords*

Bivalve; immune system; mercury; individual exposure; clearance rate

### *Capsule*

The immunotoxic effects of mercury chloride in mussels are investigated through three exposure schemes: chronic, a new sub acute regime called “in tubo”, and acute.

## 1. Introduction

Mercury in the environment has natural sources (volcanoes smokes, forests fires, geological shields) and anthropogenic sources (coal burning, gold mining, plant wastes) (IPCS, 1976, 1991). Mercury may be found through various forms such as salt, organic forms or metal (Boudou et Ribeyre, 1997). Its distribution in the marine environment is due to atmospheric transport over long distances, to water transport through rivers or to sediment resuspension after dredging works or climate events. Bioavailable forms accumulate through the food web (Gonzalez *et al.*, 2002; Booth et Zeller, 2005; Campbell *et al.*, 2005) and may induce public health outcomes through the consumption of contaminated fish and shellfish (Campbell *et al.*, 2005; Lockhart *et al.*, 2005). Mercury pollution can also lead to undoubted environmental costs through severe ecological or public health impairments (Hylander et Goodsite, 2006). The United Nations Environment Programme has recently recognized mercury as a global issue (GC 23/9 IV) and a strategy to reduce the risks of mercury was adopted in February 2006 (SAICM/ICCM.1/INF/3).

Although mercury chloride is not the most toxic mercury compound in the marine environment (Boudou et Ribeyre, 1997), it is the key form between the gaseous metal form transported through atmosphere and the methylmercury form that bioaccumulates in organism. Once entered into the organism, mercury can draw various immunotoxic effects. Methylmercury inhibits many lymphocytes functions in rodents and humans while mercury chloride can induce autoimmunity (Dieter *et al.*, 1983; Moszczynski, 1997). Mercury chloride immunotoxic effects depend on the developmental stage in rodents (Silva *et al.*, 2005), marine mammals (Lalancette *et al.*, 2003) and earthworms (Sauve et Fournier, 2005). In the aquatic environment, as filter feeders sedentary and ubiquitous animals, bivalves are favourite model animals in ecotoxicology and many xenobiotics induce immunotoxic effects, but still, further investigations are needed in immunotoxicology of aquatic species for a better understanding of the toxic process of xenobiotics in the environment (Brousseau *et al.*, 1997; Selgrade, 1999; Galloway et Depledge, 2001; Galloway et Handy, 2003; Auffret, 2005; Selgrade, 2005; Woolhiser *et al.*, 2005). Our team has been involved in the study of the immunotoxicity of mercury chloride through acute exposures of immune cells, the haemocytes, in many marine or freshwater Bivalves (Brousseau *et al.*, 2000; Sauve *et al.*, 2002; Gagnaire *et al.*, 2004) and in chronic exposures but only in *Mya arenaria* (Fournier *et al.*, 2001). Therefore mercury chloride may be used as a reference substance for comparisons between tests or methods in immunotoxicology.

Current exposure designs in aquatic ecotoxicology (chronic or acute regimes) mainly differ by routes of exposure (individuals or target cells) and time of exposure. But they both present also some inconveniences. Chronic exposures are designed to investigate the toxic effects of a chemical, or a mixture, on a group of individuals, over several days or weeks. These schemes need as many water tanks as many concentrations tested, in replication, require large amounts of contaminated water and a great number of individuals as they assert the high individual variability characteristic to the Mollusc phylum (Galloway et Depledge, 2001). Finally, *in vivo* protocols are designed to expose clumps of mussels and attached mussels may show uneven toxic responses, compared to unattached mussels, in relation to their byssinogenic activity, as in chlorine exposures (Rajagopal *et al.*, 2005). Thereby one can discuss the homogeneity of any other exposure within a clump. On the other hand, acute exposures are designed to investigate the *in vitro* toxic effects of a chemical, or a mixture. These regimens have the advantage to use only a few millilitres of contaminated media into experimental tubes or microplates, receiving target cells such as haemocytes. But in contrast to the former protocol, haemolymph of sampled individuals is pooled to have sufficient material to proceed with experiment so the sampled population gains artificially in homogeneity. Finally, whereas performing toxicological studies on animals in bad health conditions, none of these two exposure designs are, *per se*, able to take into account a gross physiological endpoint such as the clearance rate (Smaal *et al.*, 1991). Between chronic exposures of groups of individuals and acute exposures of cells, a gap exists, *i.e.* the individual step, analogous to individual treatments carried out in rodents to survey their responses to toxics with respect to the ecological features of mussels.

In order to understand mercury toxic effects and the behaviour of the immunotoxicological biomarkers in bivalves (IPCS, 2001), the purpose of this study was to examine the immunotoxicity of mercury chloride in *Mytilus edulis*, as model species in aquatic toxicology, under three exposure schemes: chronic, sub acute and acute exposures. The chronic exposure consisted in exposing mussels to mercury for 21 days; the subacute exposure consisted to a new *in tubo* exposure design for 24 h and to acute exposure *in vitro* for 3 h.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Mercury chloride solution procedure

Mercury chloride (Aldrich Chemical Company) was first dissolved in ethanol then

diluted with distilled water at  $10^{-2}$ M. Working solution ranged from  $10^{-6}$ M to  $10^{-9}$ M for chronic exposures and from  $10^{-3}$ M to  $10^{-9}$ M for acute and sub acute exposures, in accordance with previous studies (Brousseau *et al.*, 2000; Fournier *et al.*, 2001; Sauvé *et al.*, 2002). These concentrations were obtained from serial dilutions of initial solutions into seawater. Each control group (CTR) was treated with the maximum concentration of ethanol (0.01%) of the working solution diluted into seawater.

## 2.2. Mussel husbandry

Adult mussels (45mm – 55mm), *Mytilus edulis*, were collected at Metis Beach (Quebec, Canada) or at the Pointe du Diable (Plouzane, France), two sites free of chemical impacts. Mussels were transported to experimental facility, placed in acclimation tanks and were daily fed to satiety with a monoculture of phytoplankton for six days until exposures.

## 2.3. Acute exposure

As described by Brousseau *et al.* (2000) and Sauvé *et al.* (2002), hemolymph was withdrawn from 10 mussels and pooled. Nine hundred microliters of haemolymph was then added to 100µL of eight solutions of mercury chloride (control,  $10^{-9}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M,  $10^{-5}$ M,  $10^{-4}$ M, and  $10^{-3}$ M) into 5mL Falcon® polypropylene tubes and incubated for 3 hours at 15°C. This experiment was replicated five times (Table 5).

## 2.4. Sub acute exposure

This scheme was used as formerly developed by Duchemin et al. (submitted). After acclimation in tanks, individual mussels were transferred into a 50mL falcon® polypropylene tube with 30mL seawater. After 2 hours, the seawater was gently removed and replaced with a syringe by 30mL of contaminated seawater solution. Each tube was placed in a hole of a pierced board which was partly immersed in a 150L tank so that every tube was plunged into the water (**Figure 1.12**). The tank was supplied with circulating seawater at the ambient temperature of the sampling site. Seawater temperature in tubes was monitored in a 30mL seawater mussel-free tube. Therefore, each tube could be considered as an experimental replicate. For 24 hours, the mussels were exposed to mercury chloride seawater solution. From July 2004 to October 2005, *in tubo* experiments were performed (Table 5) with 15 individuals per treatment group (CTR,  $10^{-9}$ M,  $10^{-6}$ M and  $10^{-3}$ M) or 5 individuals per treatment group (CTR,  $10^{-9}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M,  $10^{-5}$ M,  $10^{-4}$ M, and  $10^{-3}$ M).

Table 6 : Summary of the number of mussels used for each exposure protocol.

	<i>CTR</i>	<i>10<sup>-9</sup>M</i>	<i>10<sup>-8</sup>M</i>	<i>10<sup>-7</sup>M</i>	<i>10<sup>-6</sup>M</i>	<i>10<sup>-5</sup>M</i>	<i>10<sup>-4</sup>M</i>	<i>10<sup>-3</sup>M</i>
<i>In vivo exposure</i>	69	69	69	69	69	-	-	-
<i>In tubo exposure</i>	40	40	35	10	40	10	10	40
<i>In vitro exposure</i>	50	50	50	50	50	50	50	50

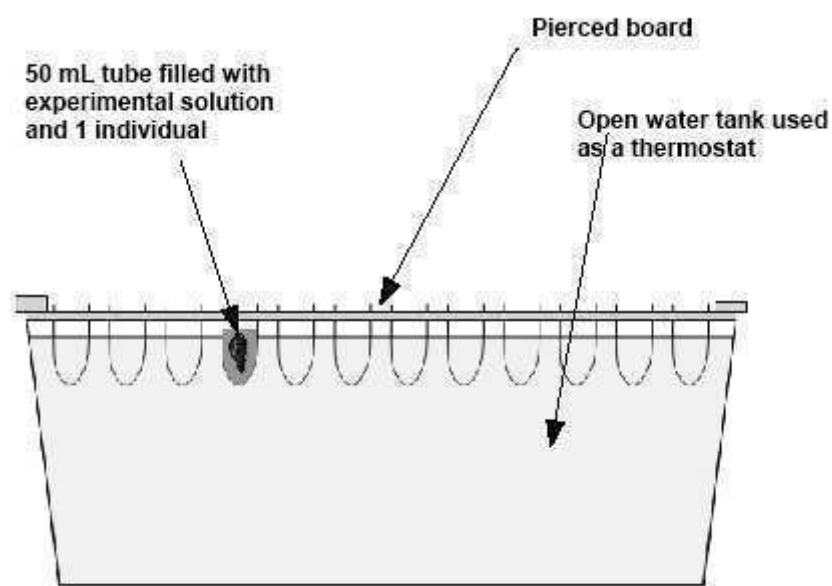


Figure 1.12 : Scheme of the *in tubo* experimental system. Mussels were individually placed into a tube filled with the working solution. Each tube is an experimental unit and is partially emerged in an open water tank which serves as a thermostat. One tube is filled with control solution only to monitor the temperature.

### 2.5. Chronic exposure

For 28 days, mussels were exposed to a gradient of mercury chloride solutions as described by Fournier *et al.* (2001) for soft-shell clams, *Mya arenaria*. Twenty-five mussels per tank were maintained in 5 tanks (control,  $10^{-9}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M), in circulating seawater and the water flow was premixed with different mercury chloride solutions which were newly prepared every one to two days. Each mercury chloride solution was mixed with  $200 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  circulating seawater with a constant flow of  $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  using a peristaltic pump (Gilson, Minipuls 2). The flow rate was daily checked. Every seven days, five mussels were sampled from each tank for hemolymph analysis from each tank. These mussels were then replaced by five new tagged individuals in order to keep the same mercury burden and to replicate the experiment. Four replicated experiments were performed. Finally, 70 mussels per treatment group were sampled (Table 5).

### 2.6. Clearance rate

To monitor the gross physiological condition of the mussels, the individual clearance rate was measured after 24h of in tubo exposures with an indirect method, the reduction of algal cells, as described by Duchemin *et al.* (submitted). The algal solution (T-iso) was used for all acclimation and feeding phases. A working solution of  $2 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$  was prepared. After the exposure period, the treated solution was gently removed from the tube and replaced by 30mL of the working solution of algal cells. After 20 min of filtering, 900  $\mu\text{L}$  of the algal solution were removed into a 5 mL falcon® tube with 100  $\mu\text{L}$  paraformaldehyde (10% final concentration). Three control tubes were also prepared to consider algae sedimentation. Algae counting were performed on the red PMT of a Facscalibur cytometer (Becton-Dickinson).

### 2.7. Hemolymph withdrawal

For each individual sampled, hemolymph was withdrawn from the anterior adductor muscle sinus, with a 2 mL syringe equipped with a 21G needle. A millilitre was collected from each individual and transferred into a 1.5mL plastic tube and stored on ice until analysis. All measurements were performed individually as described below.

### 2.8. Haemocyte mortality

Propidium iodide (PI) is a fluorescent membrane-impermeant nucleic acid intercalator which allows identifying dead cells in a cell population. In a 5 mL Falcon® tube, 50  $\mu\text{L}$  of



hemolymph (collected from treated individuals or from treated pools) were mixed with 250  $\mu\text{L}$  of anti-aggregating solution (HAAS pH = 6.7; Osmolarity = 920 mOsm.kg<sup>-1</sup>) according to Auffret and Oubella (1994). PI was added to a final concentration of 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and the tubes incubated 10 min at 4 °C in the dark before flow cytometric analysis (Brousseau *et al.*, 1998). The red fluorescence level was measured in cells on FL3 photodetector and further analyzed with CellQuest® (Becton-Dickinson) software. The percentage of haemocytes that had incorporated PI was used to measure haemocyte mortality.

### 2.9. Total haemocyte counts (THC)

For chronic exposures, THC was established in counting chambers (Malassez) under an optical microscope at 250X. For sub acute exposures, THC was performed by flow cytometry (Facsan® Becton Dickinson) from the former hemocyte preparations. The flow cytometer was operated with PBS (400 mOsm.kg<sup>-1</sup>) as sheath fluid. The flow rate was measured to allow absolute cell counts and the cells were counted arbitrarily for 52s. Finally, because it was not relevant THC was not considered for acute exposures.

### 2.10. Phagocytosis

For chronic exposures, phagocytosis was analysed by the protocol of Brousseau *et al.* (1998). Briefly, 2  $\mu\text{m}$  latex beads were added to 1 mL of hemolymph and then incubated at 20 °C for 18 h. After incubation, the suspension was deposited on a saline buffered BSA 4.5% solution and centrifuged at 300 g for 10 min to eliminate free beads. Cells were finally transfer to 500  $\mu\text{L}$  of saline buffer before being read on a Facsan® (Becton-Dickinson) on FL-1 PMT (green fluorescence) and analysed with CellQuest® software (Becton-Dickinson).

For acute and sub acute exposures, a phagocytosis assay was performed as described by Auffret *et al.* (2004), a protocol slightly modified from Brousseau *et al.* (1998). In summary, 100  $\mu\text{L}$  of hemolymph were deposit into a well of a 96-well microplate. Haemocytes were put then into contact with a solution of 2  $\mu\text{m}$  fluorescent latex beads (Yellow-green Fluoresbrite, Polysciences®) to reach a 30:1 bead:haemocyte ratio. After gentle centrifugation (4 °C, 300 g, 10 min.), the microplate was incubated for 4 h at 15 °C in the dark. To detach the cells from the well walls, HAAS complemented with trypsin (0.5 g.L<sup>-1</sup>) was finally added and the microplate was agitated for 5 min. The content of each well was then analyzed by flow cytometry (Facslibur®, Becton-Dickinson). Two parameters describing phagocytosis were calculated from CellQuest ® (Becton-Dickinson) software. The

phagocytic index was the relative number of haemocytes that has engulfed at least 3 beads. The haemocyte phagocytic capacity (HPC) was calculated as the mean number of engulfed beads within the phagocytic haemocytes population (Lehmann *et al.*, 2000).

### 2.11. Data management and statistical analysis

In order to compare all the experiments, all data have been calculated as relative to the mean of the control of the same experiment, except for the chronic exposure where the absolute value was used. Normal distribution was checked from the Kolmogorov-Smirnoff's test. In cases where the variables did not meet the assumptions of normality or heteroscedasticity, they were Log-transformed. In case of abnormality of the distribution, the test of Kruskal-Wallis was performed. A two-way ANOVA was used for the *in vivo* experiments to test the effects of the exposure duration and the concentration on the measured variables. Analysis of variance was performed on the acute and sub acute results to test the effects of concentration on the variables. All tests were performed at  $p = 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Chronic exposures

For each replicated experiment and all parameters, no significant difference was observed ( $p > 0.05$ ). Exposure to  $10^{-6}$ M of  $\text{HgCl}_2$  led to the death of 30% of the individuals after 21 days (Table 6). No significant differences did also appear between CTR and all the tested  $\text{HgCl}_2$  concentrations except for  $10^{-6}$ M. For this group, after 7 days of exposure, THC, haemocyte mortality and phagocytic index were significantly different ( $p < 0.05$ ) to the other groups. Haemocyte mortality increased while the phagocytic index decreased throughout the experimental period (Fig 29A and 2B). THC remained stable but values were systematically higher than the other groups (Fig. 29C).

### 3.2. Sub acute exposures

No individuals died during exposure. However, due to obvious acute toxicity of mercury, nearly 50% of the individuals treated with  $10^{-3}$ M mercury chloride could not be sampled for hemolymph. THC remained stable ( $p > 0.05$ ) regardless of the mercury chloride concentration except for  $10^{-4}$ M and  $10^{-3}$ M which were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than the control (Fig 30A). Haemocyte mortality was not altered by the treatments, except for the highest concentration where it was seven times higher than the control (Fig 30B). The

phagocytic index followed a marked sigmoid curve with a significant ( $p < 0.05$ ) maximum at  $10^{-8}\text{M}$  after decreasing significantly toward a plateau between  $10^{-7}\text{M}$  to  $10^{-5}\text{M}$  and falling again at  $10^{-3}\text{M}$  (Fig 30C). HPC drew a less pronounced hormetic curve (Fig 30D). The clearance rate of mussels decreased from maximum values at  $10^{-8}\text{M}$  to reach a plateau from  $10^{-7}\text{M}$  to  $10^{-4}\text{M}$ . At  $10^{-3}\text{M}$ , a minimum was reached (Fig 30E).

### 3.3. *Acute exposures*

Over the five replicate experiments, the phagocytic index increased slightly, but not significantly, below  $10^{-6}\text{M}$  followed by a dramatic decreasing phase at the highest tested concentrations of  $10^{-4}\text{M}$  and  $10^{-3}\text{M}$  (Fig 31A). The shape of the dose-response curve for HPC was very similar except the only significantly lower value was only observed for  $10^{-3}\text{M}$  (Fig 31B).

Table 7 : Cumulative number of dead mussels after 28 days of *in vivo* exposure to HgCl<sub>2</sub> among the four replicates.

<i>Cumulative probability (%)</i>	
<b><i>CTR</i></b>	0
<b><i>10-9M</i></b>	4,3
<b><i>10-8M</i></b>	4,3
<b><i>10-7M</i></b>	1,4
<b><i>10-6M</i></b>	29

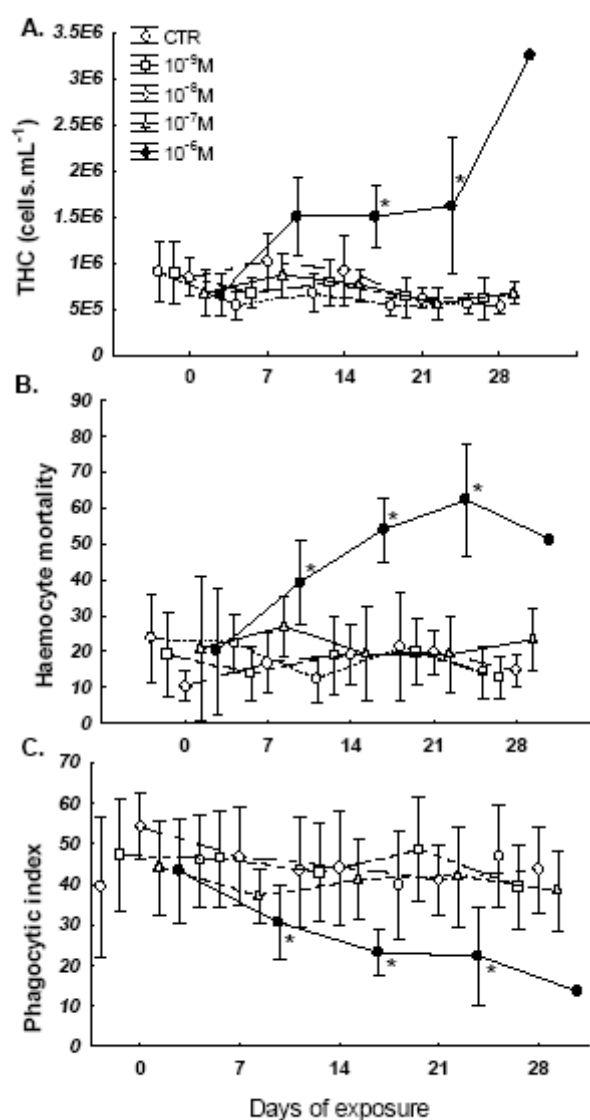


Figure 1.13 : THC (A.), haemocyte mortality (B.), and phagocytic index (C.) of mussels exposed *in vivo* to HgCl<sub>2</sub> for 28 days. Each curve corresponds to a treatment. Points represent the mean of all individuals of the 4 replicates. Bars are the confidence interval at 95% and stars (\*) indicate significant differences at  $p = 0.05$  from the control.

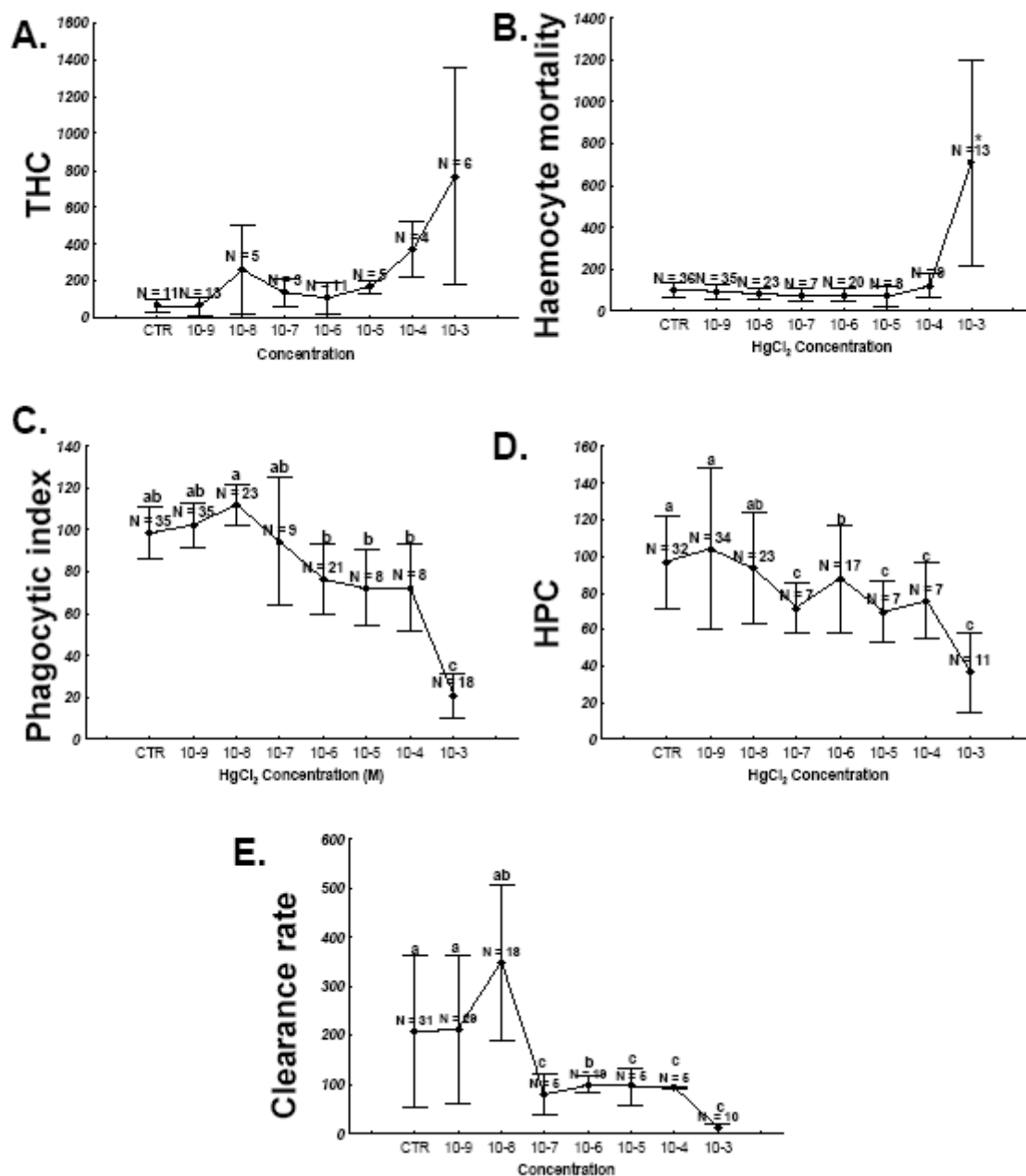


Figure 1.14 : Immune parameters and clearance rate of N individuals after 24 hours of *in vitro* exposure to HgCl<sub>2</sub> (A. THC; B. Haemocyte mortality; C. Phagocytic index; D. HPC; E. Clearance rate). The results of five experiments are reassembled. Bars are the confidence interval at 95%. Different letters indicate significant differences at  $p = 0.05$  (ANOVA or Kruskal-Wallis test for THC).

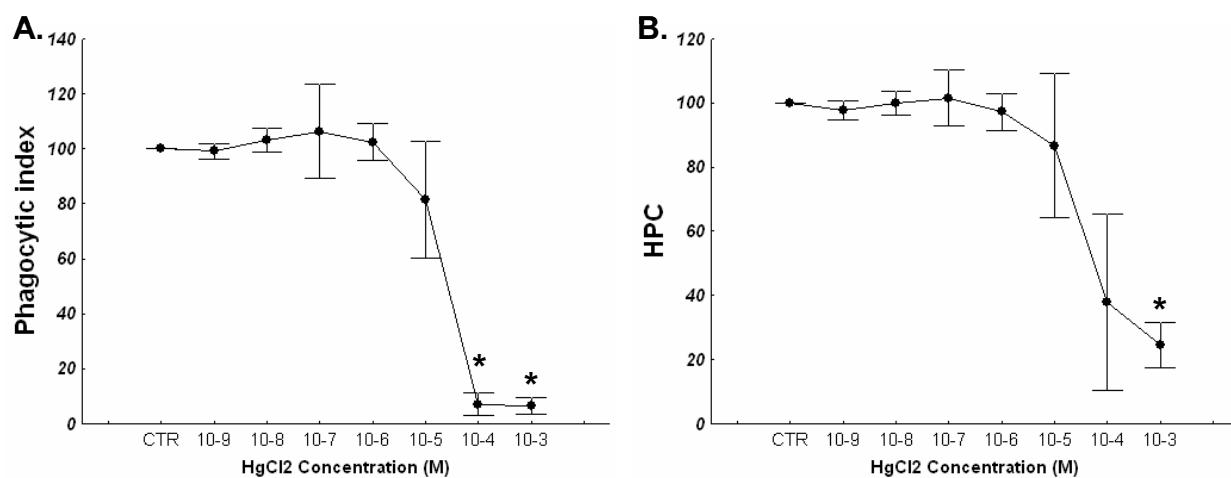


Figure 1.15 : Dose-response curve of the phagocytic index (A.) and the haemocyte phagocytic capacity (B.) of 3-hours *in vitro* exposure to HgCl<sub>2</sub> of haemocytes of the blue mussel over five replicated experiments. Each point is the mean value of the relative value to the control for each experiment and bars are the standard deviation of the relative value to the control of each experiment. Each experiment exposed pool of hemolymph collected from 10 individuals.

## 4. Discussion

### 4.1. Biological significance of the observed immunotoxic effects

At  $10^{-6}$ M of mercury chloride the mortality rate of individuals was dramatically high (only one mussel out of four replicates survived after 28 days of exposure) revealing a highly lethal chronic toxic effect of mercury chloride. Significant immunotoxic effects were observed solely for this treatment, as early as after 7 days of chronic exposure. In this study, considering both the exposure duration and the exposure concentration, the NOAEL was  $2.8 \times 10^{-6}$ M and the LOAEL was  $7 \times 10^{-6}$ M. In soft clams, *Mya arenaria*, the NOAEL for mercury chloride was  $2.8 \times 10^{-6}$ M and the LOAEL  $2.1 \times 10^{-5}$ M (Fournier *et al.*, 2001) suggesting a greater sensitivity of mussels to this contaminant. Under this scheme, mercury entering the organisms follows pathways determined by physiological processes and defined as absorption, distribution and excretion. Since mercury may draw also neurotoxic effects in vertebrates (IPCS, 1991), observed effects can be outcomes of direct toxic effects on the immune system or indirect toxic effects through the neuro-immuno-endocrine triad (Nieto-Fernandez *et al.*, 2000; Woolhiser *et al.*, 2005). In this study, mercury was not measured in hemolymph. But Kljakovic-Gaspic *et al.* (2005) observed a higher bioaccumulation level in the digestive gland compared to the gills or the whole soft tissue. Exposure of hemocytes is however likely to occur in contaminated mussels since rodents phagocytes removed and stored Hg from the body. Moreover, Hg differently impaired mice macrophages and neutrophils according to their ability to ingest the metal (Cunha *et al.*, 2004). In the present study, at  $10^{-6}$ M, for all individuals, haemocyte mortality was strongly negatively correlated with the phagocytic index explaining its decrease. These effects provided evidence for a global immunotoxicity of mercury chloride on haemocytes. This could be confirmed through acute exposures of haemocytes. In *Mya arenaria*, Fournier *et al.* (2001) suggested that haemocyte mortality only partially explained the decrease of the phagocytic index. But this toxicant also induced an increase of the number of circulating haemocytes at  $10^{-6}$ M of mercury chloride as early as after 7 days of exposure. This response has often been observed in *Mytilus edulis* and in other molluscs after several days of exposure to xenobiotics (Pipe *et al.*, 1999; Russo et Lagadic, 2004). In oysters, Auffret and Oubella (1997) observed that chemical contamination induced an impairment of hemocyte aggregation revealing a reduced capacity of cell attachment. A comparable effect of mercury could explain the rise in circulating haemocyte counts. Unfortunately, we were unable to test higher concentrations under these *in vivo* conditions or measure the body burden. But  $10^{-6}$ M is therefore a



concentration of interest that should be investigated with the other exposure regimens.

Acute in vitro exposures allowed the assessment of toxic effects on specified target cells, here the haemocytes. In vitro exposure is the current following step to chronic exposures of individuals in aquatic toxicology. Mercury chloride induced hormetic immunotoxic effects under concentration environmentally relevant. Phagocytosis (phagocytic index and hemocyte phagocytic capacity) was inhibited with exposure to concentrations higher than  $10^{-6}$ M while larger standard deviations were observed between  $10^{-7}$ M to  $10^{-4}$ M. Hormesis was in accordance with former results obtained with heavy metals in freshwater or marine bivalves (Brousseau et al., 2000; Nieto-Fernandez et al., 2000; Sauve et al., 2002). In rodents, hormesis is usually attributed to an increase in the level of intracellular total thiol (Moszczynski, 1997; Mondal *et al.*, 2005). In *Mytilus galloprovincialis*, from  $1 \times 10^{-7}$ M to  $7.8 \times 10^{-7}$ M, mercury induced intracellular  $[Ca^{2+}]$  increase (Marchi *et al.*, 2004) and this secondary cellular messenger is necessary to phagocytosis. The graphically determined EC50 was  $7.3 \times 10^{-5}$ M in *Mytilus edulis* (Sauve *et al.*, 2002). In this study EC50 was  $5.7 \times 10^{-4}$ M for the phagocytic index but, acute exposures lasted for a total of seven hours instead of eighteen hours in the former study and EC50 was calculated assuming the curves was following a logistic distribution.

Comparable results to acute and chronic exposures were obtained after 24h of individual exposure through the “in tubo” design drawing evidence this new protocol was successful at reproducing the hormesis of the phagocytic index and HPC of mercury chloride. The clearance rate appeared slightly stimulated at  $10^{-8}$ M followed by a dramatic fall at  $10^{-7}$ M, suggesting rapid systemic toxic effects. Clearance rate was therefore, in this experiment, correlated ( $r = 0.74$ ,  $p < 0.05$ ) with the phagocytic index. The low clearance rate at  $10^{-3}$ M suggested an acute toxic effect, confirmed by some observation of stress responses as gamete emission and absence of filtration activity. But since 95% of mortality occurred after only four days of chronic exposure of juvenile *Mytilus edulis* to  $10^{-3}$ M of mercury chloride (Nelson *et al.*, 1988) it was relevant to consider sub lethal toxic effect within 24 h. As a non invasive assessment of gross physiological condition, clearance rate is directly related to exposure (Smaal *et al.*, 1991) and is sensitive to toxic effects (Blackmore et Wang, 2003). This study demonstrated that clearance rate variations could reflect toxic effects after 24h of sub acute exposure. Furthermore, the stimulation phases of the phagocytic index or HPC were more pronounced (1.2 times to 3 times the control) under these conditions than under in vitro scheme. Thus,  $10^{-8}$ M appeared to be the concentration for maximal phagocytosis, before the

inhibition phase began. The lowest observable adverse effect concentration (LOAEC) was graphically determined here as  $2.7 \times 10^{-7} \text{M}$  for the phagocytic index,  $6.7 \times 10^{-8} \text{M}$  for HPC and  $5.5 \times 10^{-7} \text{M}$  for the clearance rate suggesting HPC is an endpoint more sensitive to mercury chloride. Since intracellular  $[\text{Ca}^{2+}]$  in haemocytes of mercury-challenged mussels decreases when mercury dose increases (Marchi et al., 2004), the mean number of engulfed particles (HPC) may be impaired before the number of phagocytosing cells. In field studies designed for environment assessment, LOAEC is a point of interest because, considering this level of biological response may lead to confusion with the reference site level. The plateau then observed in a range of 100 units for the phagocytic index, and 1000 units for the clearance rate of mercury chloride, suggests no difference in terms of toxicity of a  $10^{-6} \text{M}$  solution to a  $10^{-4} \text{M}$  solution, within 24h. Within this range of concentration, as for chronic exposures, THC increased while haemocyte mortality remained unchanged suggesting similar biological process. This release of hemocytes may though be a reaction to the increasing dose of mercury, just as for *Lymnaea stagnalis* exposed in vivo to atrazine (Russo et Lagadic, 2004).

#### 4.2. Benefits and drawbacks of in tubo exposure

When comparing the panel of protocols used here, chronic exposure showed immunotoxic effects only for the highest tested concentration whereas in vitro exposure provided more subtle responses as hormetic effects. Under the “in tubo” regimen, as under the chronic scheme, the toxicant can directly or indirectly impairs the immune function. But the short term toxic effects drew by the “in tubo” design provided evidence of the toxic effects of doses of mercury chloride and not of another form such as methylmercury or effects of bioaccumulation. The gap between chronic and acute exposures was resolved by this new scheme which offered the opportunity to proceed to individual exposures, in sub acute scheme. Indeed, significant immunotoxic effects appeared even for doses environmentally relevant. This new protocol also allowed us to challenge highly standardized experimental units made of an individual and the contaminated media. Moreover, “in tubo” design offered better chemical safety for ecotoxicological assays since only a litre of each solution was needed to treat 15 individuals. However, it is likely the confinement itself of the mussels in the tube is stressful, and therefore may enhance immunotoxic effects of xenobiotics. Possible artefacts would however be minimized by the protocol described here since preliminary experiments under blank conditions indicated that the immune parameters were dramatically altered only after 72h of exposure (Duchemin et al, submit).

## **5. Conclusion**

The immunotoxic effects of mercury chloride have been investigated through two different exposure regimens and the introduction of a new one. First this study has shown the relevance of the “in tubo” design measuring comparable results. Secondly, “in tubo” exposure has provided evidence of hormetic immunotoxic effects of mercury chloride in mussels, at environmental levels, even before bioaccumulating. This last point should be of concern when working on aquatic mercury risk reduction.

## **Acknowledgments**

We kindly thank Real Fournier and Jean-Bruno Nadalini from the station aquicole de Pointe-au-Père (Rimouski, Québec) for algae on-demand supply during acclimation and clearance rate analysis. Alain Mahric from the LEMAR should receive our acknowledgments for his technical help. This study has been made possible by the financial support of the Commission Franco-Québécoise and the Centre de Coopération Inter-Universitaire Franco-Québécois.

## **VI. Outils d'analyse en immunotoxicologie**

L'utilisation d'un ensemble de paramètres immunitaires est indispensable à un diagnostic pragmatique de l'évaluation environnementale. Dès lors, un outil multiparamétrique est nécessaire pour aider à la formulation d'une conclusion unique à ce type d'étude. Cet outil peut être statistique en faisant une analyse par composante principale (ACP) de tous les paramètres analysés. Dans le cas d'une évaluation de la pollution de la baie de Southampton, l'ACP a montré ainsi le fort pouvoir discriminant de la concentration totale de protéines sériques, de l'activité de la carboxylestérase et de la concentration en métallothionéine (Brown *et al.*, 2004; Galloway *et al.*, 2004). Des représentations graphiques peuvent être utilisés aussi pour avoir une vision globale des résultats de l'ensemble des paramètres. La représentation des visages de Chirnoff attribue ainsi un paramètre de l'étude à un paramètre du visage (taille des yeux, courbure de la bouche, évasement du nez, etc.) qui dépend de la moyenne et de l'écart-type pour le paramètre mesuré. La forme du visage peut être ainsi différente en fonction des sites contaminés étudiés par exemple. La représentation en radar nécessite le calcul préalable d'un indice biologique, pour chaque groupe expérimental, qui prend en compte l'ensemble des valeurs standardisées pour chaque paramètre considéré. Cette représentation graphique permet alors de comparer rapidement des résultats de plusieurs paramètres mesurés sur sites d'études différents (Beliaeff et Burgeot, 2002) ou sur le même site mais à des saisons différentes (Leinio et Lehtonen, 2005). Les deux articles suivants montrent le développement et l'utilisation d'un indice global prenant en compte plusieurs paramètres immunitaires lors d'une étude sur les conséquences écologiques du déversement de fioul suite au naufrage par l'Erika, et lors d'une étude comparative de différents sites de la côte Nord de la Méditerranée Occidentale.

**A. Suivi des réponses immunotoxiques d'huîtres cultivées dans des zones contaminées par les fuites d'hydrocarbures de l'Erika**



## NOTE

# Monitoring of immunotoxic responses in oysters reared in areas contaminated by the “*Erika*” oil spill

Michel Auffret<sup>a</sup>, Matthieu Duchemin, Sabrina Rousseau, Isabelle Boutet, Arnaud Tanguy, Dario Moraga and Alain Marhic

Laboratoire des Sciences de l’Environnement marin, UMR 6539-LEMAR, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzane, France

Received 10 February 2004; Accepted 30 July 2004

**Abstract** – Immunological alterations may be used as ecotoxicological biomarkers to detect and monitor biological effects of chemical contaminants in polluted environments. This study reports on a survey of Pacific oysters from the Atlantic coast of Brittany (France) after the “*Erika*” oil spill. Reared stocks were sampled twice a year from November 2001 to March 2003 at three impacted sites and at an additional site outside the spill area. A multiparametric diagnosis of the immune system was performed on individual hemolymph samples to identify structural, immunopathological alterations and functional impairment of immunocompetent cells. One year after the spill, severe immunological alterations were observed in a site heavily impacted by oil. Since the oysters there had higher contents of PAH compared to the other sites, it was suggested that chronic contamination, possibly generated by oil trapped in the sediments, had induced immunotoxicity. Moreover, moderate variations in some hemolymph parameters observed at the non-impacted area strongly suggested that natural environmental factors may have generated physiological stress. An immunotoxicological index applied here in order to integrate all measurements of defense-related functions appeared to be an efficient tool to identify samples suffering immunological stress.

**Key words:** Immunotoxicology / Bivalve molluscs / Monitoring / Environmental stress / PAH

## 1 Introduction

Environmental surveys of chemical contamination rely on methodological procedures where biological responses to anthropogenic signals may be quantified and used as tools for risk assessment. In marine organisms, several measurable, biological and physiological changes may now be considered as biomarkers and their application in monitoring programmes has entered an operational phase (Depledge 1994; Forbes and Forbes 1994). Among benthic invertebrates, several species of bivalve molluscs such as mussels and oysters have been introduced as biological models for research in ecotoxicology. As sedentary filter-feeders, bivalves may bioaccumulate environmental pollutants to very high tissue concentrations (Zatta et al. 1992; Phillips 1995). Under normal conditions the immune system of molluscs maintains efficient protection against most microbial or parasitic attacks. However, many chemical contaminants may act as immunosuppressors and reduce immune efficiency, even at low concentration (see reviews by Anderson 1993; Pipe and Coles 1995). Among those, polycyclic aromatic hydrocarbons found in oil,

have been demonstrated to alter many immune parameters in marine invertebrates (Coles et al. 1994; Gomez-Mendikute et al. 2002). Moreover, observations from experimental exposures suggested a species-dependent sensitivity to these contaminants (Wootton et al. 2003). Recent advances in the knowledge of how chemicals target immune mechanisms in aquatic organisms have allowed immunotoxicology to evolve as an area of primary importance for detecting early signals of physiological alterations in contaminated biota (Zeeman 1996; Auffret 2004). Field-collected resident oysters have been used to explore relationship between chemical contamination and defense-related measurements (Fisher et al. 2000; Oliver et al. 2001). Results from a two-year survey of immune characteristics in oysters reared in intertidal areas impacted by the *Erika* oil spill (December 1999) are presented here.

## 2 Material and methods

### 2.1 Animals

Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, from aquaculture stocks were collected ( $n = 15$ ) from November 2001 to March 2003

<sup>a</sup> Corresponding author: Michel.Auffret@univ-brest.fr

**Table 1.** Sampling protocol applied to oysters for the survey. Tagged cells identify collection dates in the sites (S-year: spring, A-year: autumn). N99, N00, N01, N02: spat settled respectively in 1999, 2000, 2001, 2002 in the sites.

Sites	Oyster stocks	Sampling dates			
		A-2001	S-2002	A-2002	S-2003
Pen Bé	N99	X			
	N00	X	X	X	
	N01			X	X
Le Croisic	N99	X			
	N00	X	X	X	
	N01			X	X
	N02				X
Les Moutiers en-Retz	N99	X			
	N00	X	X	X	
	N01			X	X
	N02				X
Rade de Brest	N00	X	X	X	
	N01			X	

at three locations in the Loire-Atlantique (France): Pen-Bé, Le Croisic, Les Moutiers-en Retz. The oysters were reared according to standard farming protocols from spat settled each year from 1999 to 2002. In the present paper, the stocks were identified according to spat year-of-birth. They were sampled in spring and autumn from the year after settling and thereafter, the year corresponding to a commercial size (Table 1). All of this area had been severely contaminated by hydrocarbons during the winter 1999-2000 and thereafter, following winter storms disturbing buried oil slicks. In addition, oysters were sampled from the Rade de Brest (Finistère), an area not exposed to oil contamination. There were no reports of abnormal mortalities, pathogenic attack or specific disease in any of these stocks during the survey. Growth was considered as normal by the farmers. After sampling, the individuals were transported to the laboratory and maintained 24 h, until processing in 30 L-tanks containing aerated sea-water.

## 2.2 Hemolymph analysis

Approximately 1 ml of hemolymph was withdrawn from the adductor muscle sinus of each individual as previously described by Auffret and Oubella (1995). Because only microassays were applied, a full set of immunological measurements could be performed on individual samples. Most parameters were determined using a flow cytometer (FACSCalibur™, Becton Dickinson) as described by Auffret et al. (2002). Briefly, the flow rate was measured to allow absolute cell counts. Cell mortality was measured using the propidium iodide-exclusion method (final concentration =  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Phagocytic activity was measured *in vitro* by incubating hemolymph cells with  $2.2 \mu\text{m}$  latex beads at a 1:30 cell-to-bead ratio. A phagocytic index (PI expressed in % positive cells) was calculated as the percent of cells that had engulfed three beads and more, a means to consider only the most active hemocytes. An overall phagocytic capacity (PC expressed in arbitrary units) of the hemocyte population was calculated by the CellQuest software™ from the histogram of relative

fluorescence intensity distribution, as the geometric mean of values provided by positive cells. The microbicidal capacity of hemocytes was assessed by measuring the production of reactive oxygen species (ROS) using the fluorescent probe DHR 123 (final concentration =  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ). The oxidative burst of phagocytic cells was triggered by the addition of phorbol myristate acetate (PMA) (final concentration = 100 nM). The specific, lipophilic probe DIOC<sub>6</sub> (final concentration =  $1.25 \mu\text{M}$ ) was used to detect possible alterations of the mitochondrial membrane potential  $\Delta\Psi_m$ . To detect lysosomal destabilization and cell lysis, acid phosphatase (ACP) release from lysosomes was measured in serum by microtitration using p-nitrophenyl phosphate as a substrate. A specific activity has been calculated after total serum protein (PRTS) determination. The level of metallothioneins was assayed in hemolymph cell lysates by ELISA according to Boutet et al. (2002).

## 2.3 Contaminant analysis

The concentration of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in oyster soft tissues was determined by gas chromatography/mass spectroscopy in either lyophilized or raw material. The values presented are those for the 16 compounds selected by US-EPA. Trace metal burdens were measured by atomic absorption.

## 2.4 Statistical analysis

Normal distribution of the data and homoscedasticity were examined using Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. Where necessary, data were transformed to allow variance analysis. The difference among sites for oysters reared from year-2000 spat (N00) was tested with an ANOVA. When significant differences ( $\alpha = 0.05$ ) were observed, Tukey's test was used for pairwise comparisons.

## 2.5 Data management

To increase the ecotoxicological relevance of the multi-parametric study, a "site immunotoxicological index" has been calculated from the set of biological characteristics measured in each oyster sample. The principle was to cumulate, for each sample collected, the variation of each parameter from a reference value. Considering that no immunological data were available for this species in the area impacted by the spill and that oysters reared in the additional site (Rade de Brest) were not from the same stocks as in the impacted sites, reference values were defined *a posteriori* as each parameter average from all sites and sampling dates (Table 2). First,  $\log_{10}$ -transformed values were calculated from the mean value of each biological measurement. The formulation was adapted to arbitrarily affect the unit value when the parameter was either doubled or reduced by half. The calculation for a parameter  $p_i$  in a sample was as following:

$$\text{Transformed } p_i = (\log_{10} \text{ mean value } p_i - \log_{10} \text{ "reference" value}) / \log_{10} 2.$$



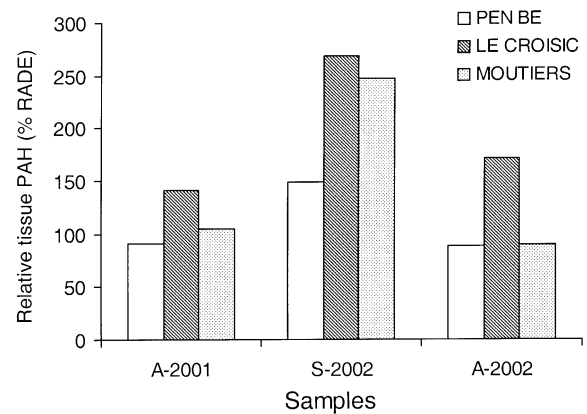
**Table 2.** Immunological parameters measured in oysters with their reference value (mean and standard error) defined from individuals collected from all sites/campaigns and corresponding ecophysiological significance factors (EPSF). Groups refer to clusters of parameter related either to structural changes in the hemolymph compartment (immunopathology) or to functional alterations in hemocytes (immunocompetence).

Group	Immunological parameter	Reference value	EPSF
Immunopathology	Total hemocyte counts	2.1 (1.3)	2
	Serum acid phosphase	48.1 (14.3)	0.5
	Cell mortality	1.05 (0.46)	1
	Granulocyte $\Delta\psi_m$	127 (106)	1
	Hemocyte metallothioneins	0.90 (0.85)	0.25
Immunocompetence	Phagocytic index	39 (10)	2
	Phagocytic capacity	1243 (340)	2
	Hemocyte microbicidal capacity	75 (26)	1

In a second step, to increase the discriminating power of highly stress-responsive parameters, an “ecophysiological significance factor” (EPSF) was applied to these values (Table 2). Establishing this factor was based on previous experimental results obtained through single contaminant assays run in the laboratory with so-called “sentinel-bivalve species”, especially mussels and oysters. It was arbitrarily high for hemolymph parameters observed to consistently vary with most contaminants. Indeed, experimental exposure to heavy metals or organics induced a conspicuous rise of circulating hemocyte numbers either in mussels (Coles et al. 1995; Pipe et al. 1999) or in oysters (Auffret et al. 2002). In all bivalve mollusc species studied yet, phagocytosis was found to be altered by various xenobiotics and has become a very sensitive tool for immunotoxicologists when hemocyte competence in non-specific immunity has to be assessed (Auffret 2004). Other measurements as cell viability, which appear more responsive when hemocytes are exposed *in vitro* to contaminants (unpublished data) were attributed here a low EPSF value. In a third step, the transformed parameters were cumulated into two groups defined as i) parameters related to structural changes in the hemolymph compartment (immunopathology) ii) parameters related to functional alterations in hemocytes (immunocompetence) (Table 2).

### 3 Results and discussion

The present study was performed on several series of adult oysters raised from spat settled either just before or after the spill depending on the site. Twenty-three months after the spill, the PAH content had decreased to reach background levels on these coasts (around 200–300  $\mu\text{g kg}^{-1}$  DW). However, values 2.5 fold higher than in the non-impacted site were measured during March 2002 at two severely impacted sites, Moutiers and Le Croisic (Fig. 1). The levels at Le Croisic remained high until the following autumn. Even if they were much below those measured in the months following the spill (over 1500  $\mu\text{g kg}^{-1}$  DW in Le Croisic, RNO 2002), the variations



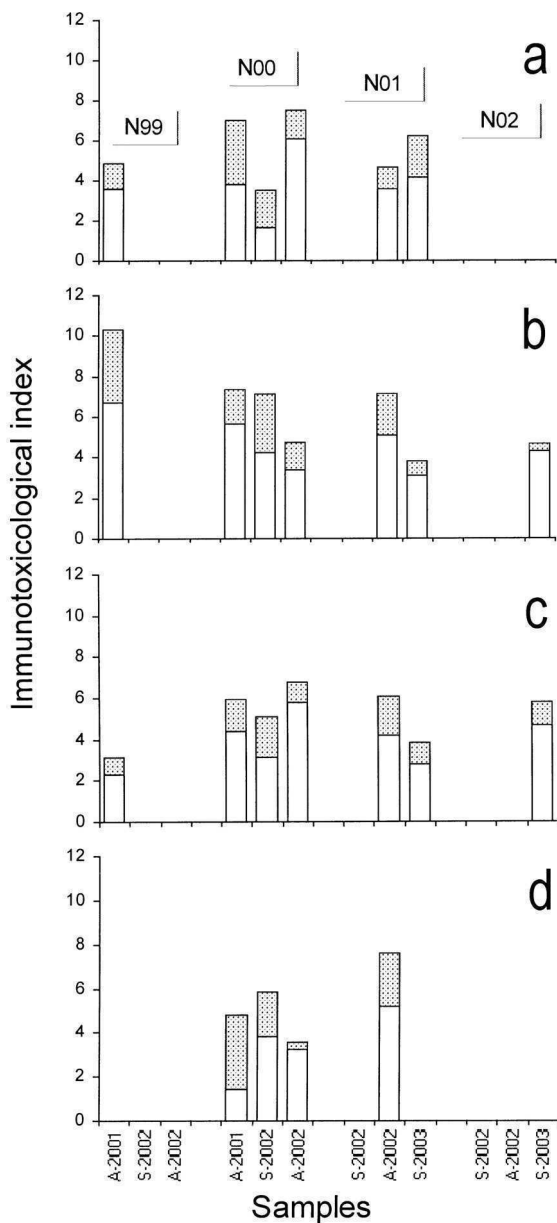
**Fig. 1.** Monitoring of PAH contents (sum of 16 compounds according to US-Environmental Protection Agency) in soft tissues from oysters settled in year 2000 in three rearing sites. Relative values were calculated as the percent of levels measured at the non-impacted site (Rade de Brest).

observed there may have resulted from local harbour activities but disturbance of oil in the sediments in the vicinity of the oyster growing site was also suspected. At the Le Croisic site, contamination by PAHs could therefore be considered as chronic. Other contaminants known to generate biological responses, namely heavy metals, were also measured in oysters. During this survey, the tissue concentration of cadmium throughout the sites remained within the range of expected values on these coasts (1.5–2.5  $\text{mg kg}^{-1}$  DW, RNO 2004). Copper levels were also found around normal at 100–150  $\text{mg kg}^{-1}$  DW, except at the site Moutiers where contents 2.5 to 3 fold higher were regularly found. The source, not related to the spill, has not been identified yet.

When the immunological parameters of oysters reared from year-1999 spat were compared among sites, conspicuous immunopathological alterations were observed in November 2001 at Le Croisic (Table 3). In these oysters, the mitochondrial function was impaired in hemocytes as indicated by low membrane potential, suggesting depressed cell viability. All parameters used to assess the phagocytic function, as the phagocytic index and the phagocytic capacity, were reduced by 50 percent compared to expected values and reflected impaired hemocyte immunocompetence. By this time, total hemocyte counts were high. After data processing, a high immunotoxicological index (value > 10) was established in this site compared with normal values expected in the range of 2–4 units (Fig. 2b). This elevated index value summarized variations of several elementary, immunological parameters from their reference value. All these features considered together strongly suggest that immunosuppression occurred in these oysters reared from year-1999 spat and settled there in spring 2000. Induction of immunotoxic responses in molluscs collected from contaminated stocks is well documented (Auffret 2004). Structural alterations in hemolymph affecting cell numbers and viability have been regularly reported (Pipe and Coles 1995) and do reflect systemic, deleterious effects during the toxicokinetic phase of contamination. Moreover, any depression of phagocytosis appears as a direct evidence of impaired immune function in individuals (Fournier et al. 2000, 2001).

**Table 3.** Average values for hemolymph parameters measured in oyster samples collected at the four sites during the *Erika* survey. Station labels and abbreviations are those used in the text. Stock labels refer to spat from which oysters were reared in each site as described in materials and methods section. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n$ : number of individual). Nd: no data. Site comparison at each sampling date (A-2001, S-2002 or A-2002) was made for N00. Values that share a same letter for the same sampling date were not statistically different.

Site	Oysters		Total hemocyte counts	Serum ACP	Cell mortality	$\Delta\Psi_m$	Hemocyte	Phagocytic	Phagocytic	ROS level
	Stock	Sampling date	$10^6$ cells $\text{ml}^{-1}$	Units. $\text{mg}^{-1}$ PRTS	%	Units	metallothioneins $\text{ng mg}^{-1}$ protein	index % positive cells	capacity Units	Units
Pen-Bé	N99	A-2001	1.5 $\pm$ 0.2 (15)	55 $\pm$ 2 (15)	0.7 $\pm$ 0.1 (15)	237 $\pm$ 22 (10)	2.04 $\pm$ 0.29 (15)	34 $\pm$ 2 (10)	1165 $\pm$ 85 (10)	121 $\pm$ 8 (10)
	N00	A-2001	4.6 $\pm$ 0.9 (15) <sup>ab</sup>	57 $\pm$ 3 (15)	nd	165 $\pm$ 32 (10)	2.94 $\pm$ 0.41 (15) <sup>b</sup>	23 $\pm$ 3 (10) <sup>a</sup>	790 $\pm$ 65 (10) <sup>a</sup>	100 $\pm$ 11 (10)
		S-2002	2.7 $\pm$ 0.4 (10) <sup>a</sup>	63 $\pm$ 7 (10) <sup>ab</sup>	0.9 $\pm$ 0.3 (10) <sup>b</sup>	112 $\pm$ 18(10) <sup>b</sup>	0.60 $\pm$ 0.07 (10) <sup>b</sup>	51 $\pm$ 2(10) <sup>a</sup>	1520 $\pm$ 95 (10) <sup>b</sup>	52 $\pm$ 5 (10) <sup>a</sup>
		A-2002	0.8 $\pm$ 0.1 (10) <sup>b</sup>	26 $\pm$ 2 (10) <sup>b</sup>	1.5 $\pm$ 0.2 (10) <sup>b</sup>	57 $\pm$ 5 (10)	0.15 $\pm$ 0.05 (10)	42 $\pm$ 3 (9)	1750 $\pm$ 55 (9) <sup>b</sup>	85 $\pm$ 5 (10) <sup>b</sup>
	N01	A-2002	1.4 $\pm$ 0.3 (10)	28 $\pm$ 3 (10)	0.7 $\pm$ 0.2 (10)	72 $\pm$ 5 (10)	0.38 $\pm$ 0.12 (8)	44 $\pm$ 4 (10)	1425 $\pm$ 100 (10)	62 $\pm$ 6 (10)
		S-2003	4.1 $\pm$ 1.2 (10)	nd	1.0 $\pm$ 0.3 (10)	38 $\pm$ 3 (10)	0.35 $\pm$ 0.06 (10)	49 $\pm$ 4 (10)	1500 $\pm$ 115 (10)	134 $\pm$ 25 (10)
Le Croisic	N99	A-2001	4.1 $\pm$ 0.6 (14)	53 $\pm$ 3 (13)	0.2 $\pm$ 0.1 (14)	40 $\pm$ 6 (10)	2.57 $\pm$ 0.37 (13)	21 $\pm$ 2 (10)	675 $\pm$ 105 (10)	77 $\pm$ 13 (10)
	N00	A-2001	2.7 $\pm$ 0.3 (13) <sup>ab</sup>	59 $\pm$ 3 (14)	0.2 $\pm$ 0.1 (15) <sup>a</sup>	446 $\pm$ 127 (10)	1.84 $\pm$ 0.34 (13) <sup>ab</sup>	34 $\pm$ 2 (10) <sup>b</sup>	780 $\pm$ 115( 10) <sup>a</sup>	73 $\pm$ 8 (10)
		S-2002	0.9 $\pm$ 0.1 (10) <sup>b</sup>	50 $\pm$ 2 (10) <sup>a</sup>	1.6 $\pm$ 0.2 (10) <sup>a</sup>	227 $\pm$ 14 (10) <sup>a</sup>	1.29 $\pm$ 0.19 (10) <sup>a</sup>	56 $\pm$ 3 (10) <sup>a</sup>	1860 $\pm$ 85 (10) <sup>a</sup>	46 $\pm$ 3 (10) <sup>a</sup>
		A-2002	1.2 $\pm$ 0.2 (10) <sup>a</sup>	37 $\pm$ 4 (10) <sup>a</sup>	0.9 $\pm$ 0.2 (10) <sup>ab</sup>	64 $\pm$ 6 (10)	0.48 $\pm$ 0.05 (10)	41 $\pm$ 3 (10)	1055 $\pm$ 85 (10) <sup>a</sup>	47 $\pm$ 4 (10) <sup>a</sup>
	N01	A-2002	0.8 $\pm$ 0.2 (10)	25 $\pm$ 2 (10)	1.9 $\pm$ 0.3(10)	104 $\pm$ 11 (10)	0.46 $\pm$ 0.08(10)	52 $\pm$ 4 (10)	1785 $\pm$ 120 (10)	84 $\pm$ 10 (10)
		S-2003	2.1 $\pm$ 0.4 (10)	nd	1.7 $\pm$ 0.4 (10)	44 $\pm$ 6 (10)	0.44 $\pm$ 0.08 (9)	38 $\pm$ 3 (10)	1105 $\pm$ 100 (10)	59 $\pm$ 4 (10)
	N02	S-2003	2.9 $\pm$ 0.6 (10)	nd	0.8 $\pm$ 0.2 (10)	31 $\pm$ 3 (10)	0.34 $\pm$ 0.09 (10)	43 $\pm$ 4(10)	1230 $\pm$ 65) (10)	72 $\pm$ 7 (10)
Moutiers	N99	A-2001	2.7 $\pm$ 0.4 (15)	58 $\pm$ 6 (15)	1.1 $\pm$ 0.3 (14)	225 $\pm$ 25 (10)	1.80 $\pm$ 0.20 (15)	35 $\pm$ 2 (10)	1080 $\pm$ 160 (10)	71 $\pm$ 5 (10)
	N00	A-2001	4.2 $\pm$ 0.5 (20) <sup>a</sup>	56 $\pm$ 1 (18)	0.6 $\pm$ 0.1 (20) <sup>b</sup>	266 $\pm$ 27 (10)	1.43 $\pm$ 0.12 (20) <sup>a</sup>	28 $\pm$ 2 (14) <sup>ab</sup>	1140 $\pm$ 85 (14) <sup>b</sup>	91 $\pm$ 13 (9)
		S-2002	1.4 $\pm$ 0.2 (10) <sup>b</sup>	58 $\pm$ 4 (10) <sup>ab</sup>	0.6 $\pm$ 0.1 (10) <sup>b</sup>	218 $\pm$ 44 (10) <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.09 (10) <sup>b</sup>	47 $\pm$ 4 (10) <sup>ab</sup>	1495 $\pm$ 80 (10) <sup>b</sup>	42 $\pm$ 5 (10) <sup>ab</sup>
		A-2002	0.9 $\pm$ 0.1 (10) <sup>ab</sup>	31 $\pm$ 4 (10) <sup>ab</sup>	0.7 $\pm$ 0.2 (10) <sup>a</sup>	47 $\pm$ 5 (10)	0.17 $\pm$ 0.05 (8)	43 $\pm$ 3 (10)	1330 $\pm$ 75 (10) <sup>c</sup>	53 $\pm$ 6 (10) <sup>a</sup>
	N01	A-2002	1.0 $\pm$ 0.3 (10)	41 $\pm$ 3 (10)	1.2 $\pm$ 0.2 (10)	90 $\pm$ 12 (10)	0.17 $\pm$ 0.03 (10)	32 $\pm$ 3 (10)	945 $\pm$ 50 (10)	53 $\pm$ 9 (10)
		S-2003	2.3 $\pm$ 0.5 (10)	nd	1.2 $\pm$ 0.2 (10)	48 $\pm$ 7 (10)	0.25 $\pm$ 0.07 (10)	34 $\pm$ 4 (10)	1025 $\pm$ 60 (10)	69 $\pm$ 5 (10)
	N02	S-2003	3.2 $\pm$ 0.6 (10)	nd	0.9 $\pm$ 0.3 (10)	38 $\pm$ 6 (10)	0.15 $\pm$ 0.03 (10)	42 $\pm$ 3 (10)	1010 $\pm$ 60 (10)	94 $\pm$ 13 (10)
Rade	N00	A-2001	2.1 $\pm$ 0.3 (15) <sup>b</sup>	60 $\pm$ 6 (15)	1.2 $\pm$ 0.3 (15) <sup>c</sup>	217 $\pm$ 30 (9)	1.42 $\pm$ 0.24 (15) <sup>a</sup>	21 $\pm$ 3 (10) <sup>a</sup>	820 $\pm$ 60 (10) <sup>ab</sup>	98 $\pm$ 7 (10)
		S-2002	1.0 $\pm$ 0.2 (10) <sup>b</sup>	70 $\pm$ 4 (10) <sup>b</sup>	1.5 $\pm$ 0.2 (10) <sup>a</sup>	88 $\pm$ 15 (10) <sup>b</sup>	1.25 $\pm$ 0.21 (6) <sup>a</sup>	38 $\pm$ 3 (10) <sup>b</sup>	965 $\pm$ 35 (10) <sup>c</sup>	33 $\pm$ 2 (10) <sup>b</sup>
		A-2002	1.3 $\pm$ (0.2 (10) <sup>a</sup>	48 $\pm$ 3 (10) <sup>c</sup>	0.9 $\pm$ 0.2 (10) <sup>ab</sup>	56 $\pm$ 5 (10)	0.42 $\pm$ 0.10 (10)	41 $\pm$ 3 (10)	1290 $\pm$ 65 (10) <sup>ac</sup>	78 $\pm$ 8 (10) <sup>b</sup>
	N01	A-2002	1.0 $\pm$ 0.2 (10)	40 $\pm$ 8 (10)	2.6 $\pm$ 0.3 (10)	109 $\pm$ 12 (10)	0.19 $\pm$ 0.02 (8)	45 $\pm$ 3 (10)	2090 $\pm$ 130 (10)	101 $\pm$ 14 (10)



**Fig. 2.** Cumulative immunotoxicological index (white bar: immunopathology, grey bar: immunocompetence) calculated in oysters sampled from November 2001 to March 2002 at the three impacted sites (a: Pen Bé, b: le Croisic, c: Moutiers) and at the non-impacted area (d: Rade de Brest). The samples were grouped on the horizontal axis according to spat characteristics. Sample labels are those detailed in Table 1.

Stocks reared from year-2000 spat had been settled in impacted sites 10 to 15 months after the spill. At Le Croisic, very high hemocyte numbers were measured in November 2001 (Table 3). In this sample however, all phagocytosis parameters were abnormally low. Consequently, the immunotoxicological index reached nearly 8 units (Fig. 2b). The spring after, this high level was maintained. Persistent alterations of immune parameters at this site could be related to environmental stress generated by winter conditions and possibly, hydrocarbon release as mentioned above. At Pen Bé and Moutiers, high

index values were calculated in autumn 2001 and 2002 (Figs. 2a,c), suggesting a seasonal variation pattern. Finally, the most severe immunotoxic alterations were observed at Le Croisic in the first samples of the survey, more than twenty months after the spill. This persistence of effects suggests that they rather resulted from chronic contamination than from the spill itself. All the sites appeared to have recovered two years later.

In the non-impacted area, immune parameters were occasionally found altered, as a reduced phagocytic activity in November 2001 and low numbers of circulating cells in 2002 (Table 3). Consequently, the index was above expected values (Fig. 2d) but taken as a whole, this immunological condition most probably revealed temporary, environmental stress in this estuarine site. Indeed, physico-chemical factors such as salinity and temperature naturally varying in coastal waters may affect hemocyte activities (Fisher 1988; Anderson 1993; Auffret and Oubella 1994). Even if site-specific differences in hemocyte characteristics may occur in oysters (Oliver and Fisher 1995), the immunological changes revealed here strongly suggest that natural environmental factors may also generate physiological stress. Complementary investigations would be necessary to study its influence on immune parameters of benthic organisms and especially, possible synergistic effects with pollution.

The immunotoxicological index allowed here to identify samples suffering immunological stress, even if the reference value had been calculated from all sites and sampling dates. This calculation procedure was found reasonable here because the survey was run after the major episode of contamination in a wide geographic area. By including samples where immunological changes occurred, reference values were undoubtedly overestimated and slight alterations obscured. To increase the discriminating power of the method, it is recommended that baseline values would be obtained for this species by a long-term survey in pristine sites and subsequently integrated in index calculation. The definition of quantitative, descriptive parameters deriving from multiparametric sets of data generally contributes to the development of physiological biomarkers to assess possible effects of environmental stress in contaminated ecosystems. For immunological alterations which appear as various structural and functional changes, the calculation of an immunotoxicological index may increase the ecotoxicological relevance of the observations.

**Acknowledgements.** The authors wish to thanks the French MEDD for funding this monitoring study and the oyster farmers P. Chellet, J. Garel and G. Le Gal who reared the stocks and kindly collaborated to sampling campaigns.

## References

- Anderson R.S., 1993, Modulation of nonspecific immunity by environmental stressors. In: Couch J.A., Fournie J.W. (Eds.), *Pathobiology of marine and estuarine organisms*, CRC Press, London, pp. 482-510.
- Auffret M., 2004, Bivalves as models for marine immunotoxicology. In: Tryphonas H., Fournier M., Blakey B.R., Smits J.E.G., Brousseau P. (Eds.), *Investigative immunotoxicology, Models and Approaches in Immunotoxicology*. CRC Press (in press).

- Auffret M., Oubella, R., 1994, Cytometric parameters of bivalve molluscs: Effect of environmental factors. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C. (Eds.), *Modulators of Fish Immune Responses*. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, pp. 23-32.
- Auffret M., Oubella R., 1995, Cytology and cytometric analysis of bivalve mollusc hemocytes. In: Stolen J.S., Fletcher T.C., Smith S.A., Zelikoff J.T., Kaatari S.L., Anderson R.S., Söderhäll K., Weeks-Perkins B.A. (Eds.), *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, pp. 55-64.
- Auffret M., Mujdzic N., Corporeau C., Moraga D., 2002, Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster. *Mar. Environ. Res.* 54, 585-589.
- Boutet I., Tanguy A., Auffret M., Riso R., Moraga, D., 2002, Immunochemical quantification of metallothioneins in marine molluscs: Characterization of a metal exposure bioindicator. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1009-1014.
- Coles J.A., Farley S.R., Pipe R.K., 1994, Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 30, 367-379.
- Coles J.A., Farley S.R., Pipe R.K., 1995, Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Dis. Aquat. Org.* 22, 59-65.
- Depledge M.H., 1994, The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Fossi M.C., Leonzio C. (Eds.), *Non destructive biomarkers in vertebrates*. Lewis Publishers, pp. 271-295.
- Fisher W.S., 1988, Environmental influence on bivalve hemocyte function. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18, 225-237.
- Fisher W.S., Oliver L.M., Winstead J.T., Long E.R., 2000, A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: Associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquat. Toxicol.* 51, 115-138.
- Fournier M., Cyr D., Blakley B., Boermans H., Brousseau P., 2000, Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *Am. Zool.* 40, 412-420.
- Fournier M., Clermont Y., Morin Y., Pellerin J., Brousseau P., 2001, Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 161, 201-211.
- Forbes V.E., Forbes T.L., 1994, *Ecotoxicology in theory and practice*. Chapman and Hall, London.
- Gomez-Mendikute A., Etxeberria A., Olabarrieta I., Cajaraville M.P., 2002, Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene. *Mar. Environ. Res.* 54, 431-436.
- Oliver L.M., Fisher W.S., 1995, Comparative form and function of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes from Chesapeake Bay (Virginia) and Apalachicola Bay (Florida). *Dis. Aquat. Org.* 22, 217-225.
- Oliver L.M., Fisher W.S., Winstead J.T., Hemmer B.L., Long E.R., 2001, Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. *Aquat. Toxicol.* 55, 203-222.
- Phillips D.J.H., 1995, The chemistries and environmental fates of trace metals and organochlorines in aquatic ecosystems. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 193-200.
- Pipe R.K., Coles J.A., 1995, Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish. Shellfish Immunol.* 5, 581-595.
- Pipe R.K., Coles J.A., Carissan F.M.M., Ramanathan K., 1999, Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 46, 43-54.
- R.N.O., 2002, Surveillance du Milieu Marin, Travaux du Réseau National d'Observation de la Qualité du Milieu marin, Bulletin 2002. Ifremer, Nantes.
- R.N.O., 2004, Réseau National d'Observation de la Qualité du Milieu marin, <http://www.ifremer.fr/envlit/surveillance/>.
- Wootton E.C., Dyrinda E.A., Pipe R.K., Ratcliffe N.A., 2003, Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve species. *Aquat. Toxicol.* 65, 13-25.
- Zatta P., Gobbo S., Rocco P., Perazzolo M., Favaro M., 1992, Evaluation of heavy metal pollution in the venetian lagoon by using *Mytilus galloprovincialis* as biological indicator. *Sci. Total Environ.* 119, 29-41.
- Zeeman M., 1996, Comparative immunotoxicology and risk assessment. In: Stolen J.S., Zelikoff J.T., Twerdok L., Bayne C., Fletcher T.C., Hefti E., Secombes C., Anderson D.P., Kaatari S. (Eds.), *Modulators of immune responses*. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, pp. 317-329.

**B. Approche multiparamétrique des réponses  
immunotoxiques de moules de Méditerranée occidentale**



# A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean

Michel Auffret<sup>a,\*</sup>, Sabrina Rousseau<sup>a,1</sup>, Isabelle Boutet<sup>a</sup>, Arnaud Tanguy<sup>a,2</sup>,  
Jacques Baron<sup>b</sup>, Dario Moraga<sup>a</sup>, Matthieu Duchemin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR CNRS 6539-LEMAR, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

<sup>b</sup>Observatoire du Domaine Côtier, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

Received 29 October 2004; received in revised form 14 September 2005; accepted 10 October 2005

Available online 13 December 2005

## Abstract

As a part of the multidisciplinary program Biological Effects of Environmental Pollution in Marine Coastal Ecosystems of the European Commission, this study aimed to validate immunological alterations as biomarkers of exposure to chemical contamination in polluted areas of Western Mediterranean. The status of the immune system has been assessed in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by measuring several immunopathological and immunocompetence parameters. Alterations of total hemocyte counts, lysosomal stability, and phagocytosis were among the most reliable effects observed in polluted sites and suggested immunosuppressive conditions in contaminated mussels. An immunotoxicological index was calculated from the set of individual data. By providing a single value per sampling station to score immunological alterations in mussels, this novel approach allowed recognition of a gradient of perturbation correlated to pollution intensity in two of the three sites monitored. Processing a set of biological parameters by this method was found to increase the ecotoxicological relevance of such multiparametric studies for the assessment of chemical contamination in coastal waters.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Immunotoxicology; Bivalve mollusks; Environmental contamination; Population survey; Immunotoxicological index

## 1. Introduction

Various procedures for environmental surveys, including monitoring programs, networks for ecological watch, and

institutional observatories, have been set up and are now operational for medium- and long-term monitoring of marine ecosystems exposed to chemical contamination. It is necessary to acquire and study biological variables as signals produced by biota in response to habitat disturbance to increase knowledge of mechanisms of action of pollutants in coastal ecosystems and to provide better tools for site management.

Many chemicals released in the environment are able to generate toxicity in aquatic organisms. Recent knowledge on biochemical, cellular, and other genotoxic effects has allowed development of useful so-called exposure biomarkers (Depledge, 1994). Among alterations identified in physiological systems, chemically induced immunological disorders have been well documented in an increasing number of species. Immunotoxicology is now a fertile domain to develop biomarkers of effect able to detect probably less specific but sensitive signals for deleterious effects of

**Abbreviations:** ACPS, serum acid phosphatase; BEEP, biological effects of environmental pollution in marine coastal ecosystems; DW, dry weight; EC, European commission; HAAS, hemocyte antiaggregant solution; MT, metallothionein; NR, neutral red; NBT, nitro blue tetrazolium; OD, optical density; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons; PC, phagocytic capacity; PCBs, polychlorinated biphenyls; PI, phagocytic index; PRTC, total hemolymph cell proteins; PRTH, total hemolymph proteins; PRTS, total serum proteins; ROS, reactive oxygen species; RT, room temperature; THC, total hemocyte counts; WP3, work package 3

\*Corresponding author.

E-mail address: [Michel.Auffret@univ-brest.fr](mailto:Michel.Auffret@univ-brest.fr) (M. Auffret).

<sup>1</sup>Present address: IFREMER DEL, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes, France.

<sup>2</sup>Present address: Station Biologique de Roscoff, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France.

environmental contamination (Luster et al., 1989; Bernier et al., 1995; Zeeman, 1996; Burchiel et al., 1997). Any application of such biomarkers in monitoring programs, however, needs preliminary field studies for validation.

Several benthic species of annelids, mollusks, and echinoderms are interesting biological models useful to research in ecotoxicology. As filter-feeders, bivalve mollusks bioaccumulate for most environmental pollutants, including heavy metals and organics (Zatta et al., 1992; Phillips, 1995; Gunther et al., 1999). The process of bioconcentration is obviously an aggravating factor in toxicity. Furthermore, from an ecological point of view, this phenomenon leads to a real integration of chronic contamination in sites usually classified as moderately polluted. Oysters and mussels, which constitute large populations with rapid turnovers in intertidal or subtidal layers of estuarine ecosystems, are now considered ecosentinels in ecotoxicological monitoring programs. As demonstrated by exposure of mussels in the laboratory, several classes of xenobiotics are able to induce severe alterations of both structure and function in their immune system, even at low concentration (Coles et al., 1994, 1995; Pipe and Coles, 1995). In complement, investigations on individuals sampled in the field demonstrated that immunotoxicity could be used to monitor adverse biological effects in polluted areas (Pipe et al., 1995; Cajaraville et al., 2000).

The present study aimed to validate the use of immunological alterations in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of chemical contamination within the framework of the EC program “Biological Effects of Environmental Pollution in Marine Coastal Ecosystems” (2001–2004). Three polluted sites of Western Mediterranean coasts were selected by the Work Package 3 (WP3) because of their differences in contamination profile. The main issues to be addressed here were (i) the ability of immunological biomarkers to detect slight to marked differences in contamination among sampling stations within these sites and (ii) the sensitivity to other factors such as sampling period, other environmental factors, and biological cycles. For that purpose, a standardized set of immunopathological and functional parameters was measured in mussels sampled twice a year to assess possible seasonal changes in either the environment or the biota. The former category of parameters included hemocyte counts, cell viability, and lysosomal stability. In complement, cellular detoxication activity based on the expression of metallothioneins in hemocytes has been investigated. The phagocytic activity of hemocytes and the production of intracellular ROS were evaluated as functional parameters.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and sampling sites

Adult mussels, *M. galloprovincialis*, with shell length ranging from 40 to 60 mm ( $n = 30$ ), were collected by scuba divers from natural beds settled

on rocky shores and harbor piers. The sampling stations were located on maps during the first campaign in May 2001 (BEEP 01) and resampled during following campaigns in September 2001 (BEEP 02), September 2002 (BEEP 04), and May 2003 (BEEP 05). The sites were not sampled in May 2002 because of technical problems.

The BEEP program included three sites of the Western Mediterranean sea, in France, Italy and Spain (Fig. 1), all considered “hot spots” of marine coastal pollution. The extreme variety of molecules presumably released by human activities in these areas made the chemical charge an unsatisfactory picture of the ecotoxicological risk. Consequently, it was decided by the WP3 component of BEEP to study several stations in each of the three sites to provide an extensive range of toxic potential (Beliaeff and Bocquené, 2004). The stations were located with respect to the main identified pollution sources to follow a suspected contamination gradient. The most distant from the hot spot was considered the reference station (L label in the text below for low pollution level). Others were located either at the hot spot (H label for high pollution level) or near a source of moderate contamination (M label for medium pollution level). When a distinct toxicological profile appeared for a given contamination level, an additional station was sampled (sublabels a and b). For example, the French station Ha was located near petrochemical plants when station Hb received urban sewage. The Italian station Ha was located inside Genova harbor and station Hb outside. The actual contamination level of the sites was assessed through a chemical analysis for heavy metals and selected organics provided to BEEP WP3 by other participants, namely IFREMER-Nantes and the University of Bordeaux.

### 2.2. Collection of hemolymph and cell preparation

The mussels were processed on board the oceanographic research vessel “L’Europe” chartered for BEEP campaigns. Hemolymph was withdrawn from the adductor muscle sinus of each individual as previously described by Auffret and Oubella (1995) and immediately processed. All steps of assays requiring live cells were performed on board the vessel. Cell extracts or hemolymph fluids were fixed or frozen as described below and stored on board in appropriate conditions (refrigerator, freezer, or liquid nitrogen). All final analyses were performed in the laboratory under standardized conditions. Since the total volume of hemolymph obtained in a single mussel ranged from 0.5 to 1 mL, all assays and measurements could not be performed for each individual. Consequently, at each station, subsamples of 10 mussels were processed as following: one for THC, one for NR uptake and NBT assays, and one for the phagocytosis assay. The hemolymph fluid (serum) and the cell fraction were obtained from this last batch.

### 2.3. Determination of cell counts

THC were performed in flow cytometry (FACSCalibur, Becton–Dickinson) for paraformaldehyde-fixed hemocyte suspensions ( $n = 10$ ). The flow cytometer was operated with phosphate-buffered saline (400 mOsm  $\text{kg}^{-1}$ ) as sheath fluid. The flow rate was measured to allow absolute cell counts and the number of events set to 10,000. The results were expressed in  $10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ .

### 2.4. Protein measurement

The total protein contents of hemolymph were measured using the Bio-Rad DC assay (Bio-Rad Laboratories) in samples ( $n = 10$ ) prepared on board the vessel from freshly withdrawn hemolymph. The hemolymph fluid and the cell fraction were obtained by centrifugation (5 min, 5000g) and stored frozen. Their protein contents, PRTS and PRTC were expressed in  $\text{mg mL}^{-1}$  serum or in  $\text{mg mL}^{-1}$  supernatant. Since direct measurement of cell numbers could not be achieved on board, protein measurement in total hemolymph (PRTH) allowed indirect quantification of the number of cells in this fluid.

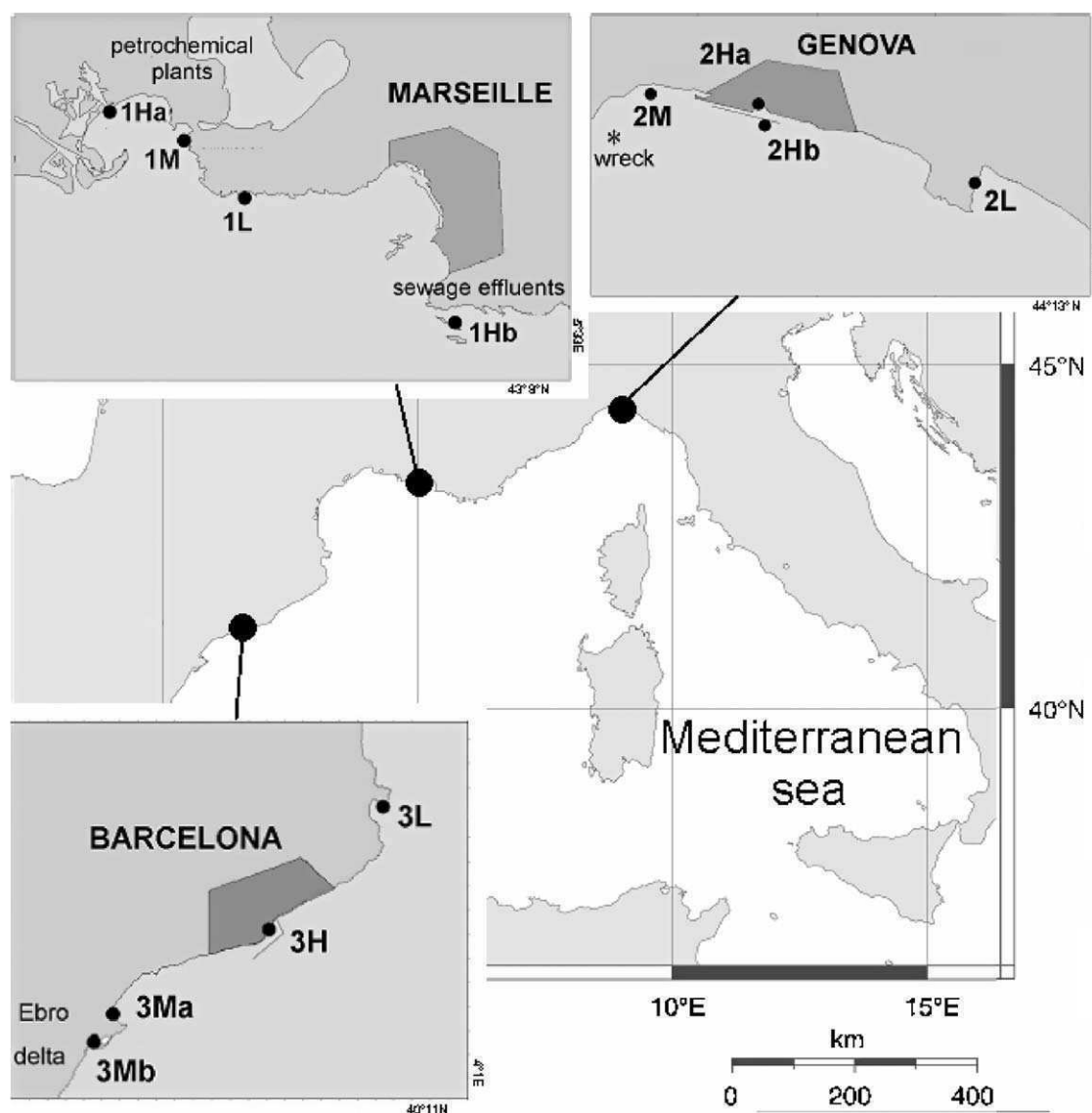


Fig. 1. Geographical situation of the three sites monitored from May 2001–2003 on the French, Italian, and Spanish coasts. The sampling stations were located according to the main identified pollution sources to follow a suspected contamination gradient. H, hot spot; L, low pollution level; M, medium. Sublabels a and b indicate additional stations for a given pollution level.

### 2.5. Hydrolase release assay

To detect possible lysosomal destabilization and cell lysis, the activity of acid phosphatase, a hydrolase naturally stored in hemocyte lysosomes, has been measured in serum by microtitration. Hemolymph supernatants ( $n = 10$ ) were obtained by centrifugation (5 min, 5000g) and frozen on board the vessel until use. The substrate (*p*-nitrophenyl phosphate, final concentration 4.4 mM) was prepared in 0.2 M citrate buffer, pH 4.6. The assay was performed in 96-well microplates maintained 60 min at RT in the dark. The reaction was stopped by addition of 1 N NaOH and the plates were read at 405 nm in a Multiskan MS reader after calibration with *p*-nitrophenol as a reaction standard. The unit of enzyme activity was calculated in nmol *p*-nitrophenol mg protein<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. The results were expressed as units ACPS per mg PRTS.

### 2.6. Membrane stability assay

To detect possible membrane destabilization and loss in cell integrity, the neutral red uptake has been assayed in hemocytes by a

method modified from Pipe (1995). The dye (NR, final concentration 0.33 mg mL<sup>-1</sup>) was prepared in phosphate-buffered saline, pH 7.5. Hemolymph cells from mussels ( $n = 10$ ) were incubated on board in 1.5 mL plastic microtubes for 1 h at RT and washed twice in HAAS prepared according to Auffret and Oubella (1995). After the last centrifugation, the pellets were stored at -20 °C. The amount of NR associated with the cell fraction has been measured in the laboratory and the results expressed as units per mg PRTS.

### 2.7. Measurement of stress response proteins

The level of MTs in lysates prepared from the cell fraction of hemolymph (see above) has been measured by Enzyme-linked immunosorbent assay according to the protocol described by Boutet et al. (2002). This assay used an antiserum raised against a recombinant MT obtained from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The results were expressed in ng MT per mg PRTC.



## 2.8. Phagocytosis assay

A protocol for measurement of the phagocytic activity by flow cytometry has been adapted from [Voccia et al. \(1994\)](#) to allow on-board processing of hemolymph cells. Briefly, for each individual ( $n = 10$ ), 50  $\mu\text{L}$  of hemolymph was pipetted in 2 replicate wells of a 96-well microplate. The cells were allowed to settle for 1 h and the supernatant was replaced by 100  $\mu\text{L}$  incubation medium containing 2- $\mu\text{m}$  yellow latex beads (Fluoresbrite, Polysciences) suspended in Tris buffer supplemented with glucose according to [Anderson et al. \(1992\)](#). Considering the expected range of THC variation in mussels, the bead concentration was set to  $6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  to provide a minimal bead to cell ratio of about 50:1. After gently mixing, the plate was covered and incubated in the dark for 4 h at RT. Afterward, to detach the cells, the supernatant was replaced by HAAS containing  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  trypsin. After 3 min, buffered paraformaldehyde was added (final concentration = 1%) as a fixative and the plate stored at  $4^\circ\text{C}$ . Upon return to the laboratory, the cells were collected from the wells of the microplate and further processed in the flow cytometer. A phagocytic index (PI) was calculated as the percentage of events detected by the cytometer corresponding to the fluorescence intensity emitted by at least three beads, as recommended by [Voccia et al. \(1994\)](#) to consider the most active cells in phagocytosis. The results were expressed as % positive cells. An index of overall phagocytic capacity (PC) was calculated by CellQuest software from the histogram of relative fluorescence intensity distribution as the geometric mean of values provided by cells having engulfed at least three beads. The results were expressed in arbitrary units.

## 2.9. Hemocyte microbicidal capacity

The production of microbicidal ROS by phagocytes has been assessed by an assay adapted from [Pipe \(1995\)](#). The intracellular ROS production was measured through NBT reduction from a soluble yellow product to insoluble blue formazan. Briefly, hemolymph samples ( $n = 10$ ) were distributed in replicate into 1.5-mL plastic microtubes. The cells were chemically stimulated by the membrane stimulant phorbol myristate acetate (final concentration 20 nM) and then incubated at RT in the dark for 30 min with NBT prepared at 0.1% in desionized water (final concentration 0.04%). The cells were further processed according to the original method and the optical density measured in the laboratory. The microbicidal capacity was expressed as units per mg PRTH.

## 2.10. Data management

To rationalize the management of data generated through this multiparametric analysis, a “station immunotoxicological index” has been calculated from the set of biological measurements as proposed by [Auffret et al. \(2004\)](#) to increase the relevance of such ecotoxicological surveys. This method initially set up with oysters was adapted here to mussels. The principle was to cumulate, for each sample collected at a station within a site, the variation of each parameter from a reference value. The method included three steps for each parameter. First, the variation for a parameter  $p_i$  in a sample was considered with respect to the ratio to its reference value. Taking the absolute value made both trends of variations, namely increase and decrease, contribute together to the index value. The formula was further adapted to arbitrarily affect the unit value when the parameter was either doubled or reduced by half:

transformed  $p_i = |\log_{10}(\text{mean value } p_i / \text{reference value})| / \log_{10} 2$ .

Second, the transformed parameters were cumulated into two groups defined as (i) parameters concerning structural changes in the hemolymph compartment (immunopathology) and (ii) parameters concerning functional alterations in hemocytes (immunocompetence). Third, since the number of measured immunological parameters varied among campaigns, each index was normalized by dividing its value by the number of variables.

## 2.11. Statistical analysis

All hemolymph parameters obtained from samples were compared with a one-factor analysis of variance (ANOVA) under Statgraphics software to discriminate among seasons, sites, and stations within sites. When a statistical difference ( $P < 0.05$ ) was obtained, statistically homogenous groups were searched among the mean values with a 95% confidence interval. When the variances were found not equal, a nonparametric test (Kruskal–Wallis) was applied to compare mean values.

The relationship between the immunotoxicological index and the established pollution gradients was statistically analyzed by assuming that if index values and contamination levels are linked then the station ranking using the L, M, and H labels should correspond, respectively, to the low, medium, and high index values. Additional stations (labeled a and b) were not interranged here. Samples from Italy were not included in this analysis since the expected pollution gradient was not sustained by chemical data. If the index values were randomly distributed (i.e., if the values were not related to pollution) then the probability of obtaining this ranking would be

$$P = \frac{2}{4!} = \frac{1}{12}.$$

Consequently, the probability that obtaining a ranking of index values fitting with the pollution gradient in the absence of any link would be realized a minimum of  $X$  times over  $n$  trials (i.e., sampling session) is given by a binomial distribution:

$$X \rightarrow B\left(\frac{1}{12}; n\right).$$

# 3. Results

## 3.1. Analysis of chemical data

The predicted pollution gradient was sustained by chemical measurements in sediments and mussel tissues, except in Italy. All values for sediments were low in L stations, except for metals in Italy ([Figs. 2 and 3](#)). In France, M and H sites had low to moderate values for heavy metal ([Fig. 2B](#)), whereas PAHs were high in tissues ([Fig. 3A](#)). The low PAH concentration in 1Ha sediments ([Fig. 3B](#)) remained unexplained considering the proximity of huge petrochemical plants ([Fig. 1](#)). The very high level for PCBs in 1Hb ([Fig. 3B](#)) could represent urban sewage contribution. In Spain, the Barcelona harbor appeared indeed as a hot spot with very high levels in metals and organics. In Italy, unexpectedly high levels were measured in sediments of the presumed less-contaminated (L and M) stations, especially for chromium, lead, and copper ([Fig. 2B](#)). However, this was not the case in mussel tissues ([Fig. 2A](#)). The very high value for PAHs in sediments from 2 M station ([Fig. 3B](#)) likely resulted from a huge oil spill (tanker “Haven”) that occurred in 1991 in this area.

## 3.2. Overall hemolymph status of mussels: immunopathological parameters

The mean values for each immunological measurement, standard deviations, and sample sizes, are given in [Table 1](#) with results of the statistical analysis.

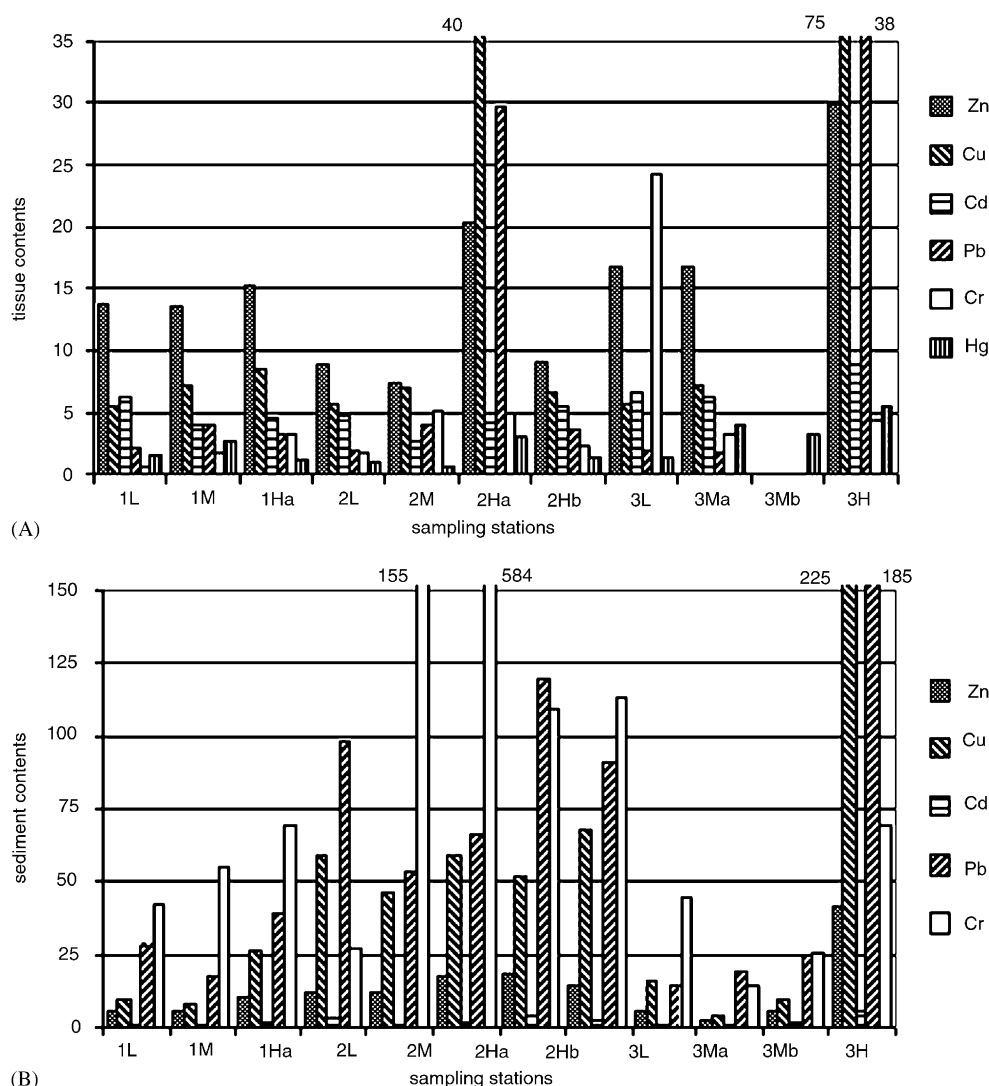


Fig. 2. Heavy metal contents measured in mussel soft tissues (A) and in sediments (B) at the three sites monitored during this study. Values are expressed in  $\text{ng} \cdot 10^3 \text{ g DW}^{-1}$  for Cu, Pb, and Cr, in  $\text{ng} \cdot 10^2 \text{ g DW}^{-1}$  for Zn, and in  $\text{ng} \cdot 10^4 \text{ g DW}^{-1}$  for Cd and Hg. The sampling stations were located according to the main identified pollution sources to follow a suspected contamination gradient. H, hot spot; L, low pollution level, M, medium. Sublabels a and b indicate additional stations for a given pollution level.

At the French site, the highest THC values were obtained in mussels collected from medium or highly polluted stations. The same pattern was observed in Spain, except in September 2002 and May 2003. In contrast, uneven variations occurred in Italy. Positive THC gradients with increasing exposure level appeared in Spain and France in September 2001 ( $P = 0.03$  and  $0.001$ , respectively) and 2002 ( $P < 0.001$ ).

A moderate augmentation of total serum proteins regularly occurred in French contaminated stations but was significant ( $P = 0.012$ ) only in September 2001. In Spain, a comparable trend was observed, except in May 2003, when very low values were measured in all contaminated stations. In Italy, uneven variations occurred throughout the survey.

The NR uptake by hemolymph cells was reduced at Spanish contaminated stations in September 2002 ( $P = 0.001$ ) and May 2003 ( $P = 0.002$ ) but no comparable

effect could be detected at the other sites. No data were available before September 2002. Another potential indicator of cellular damage, the release of lysosomal acid phosphatase, gave no clear pattern throughout the survey. Occasionally, as in Spain in May 2001 or in France in September 2002, the ACPS level increased at contaminated stations ( $P = 0.01$  and  $0.024$ , respectively) but no correlation with a reduced NR uptake could be established.

In May 2001, MT levels were higher at all French stations exposed to contamination ( $P = 0.06$ ), except at the additional station 1Hb located near the city of Marseille. This parameter was also high ( $P = 0.019$ ) at Barcelona harbor in May 2001 and again in September 2001 ( $P = 0.06$ ). In Italy, an unexpected lower level ( $P = 0.078$ ) was found in September 2001 at the M station relative to the other locations. No gradient appeared in the French site.

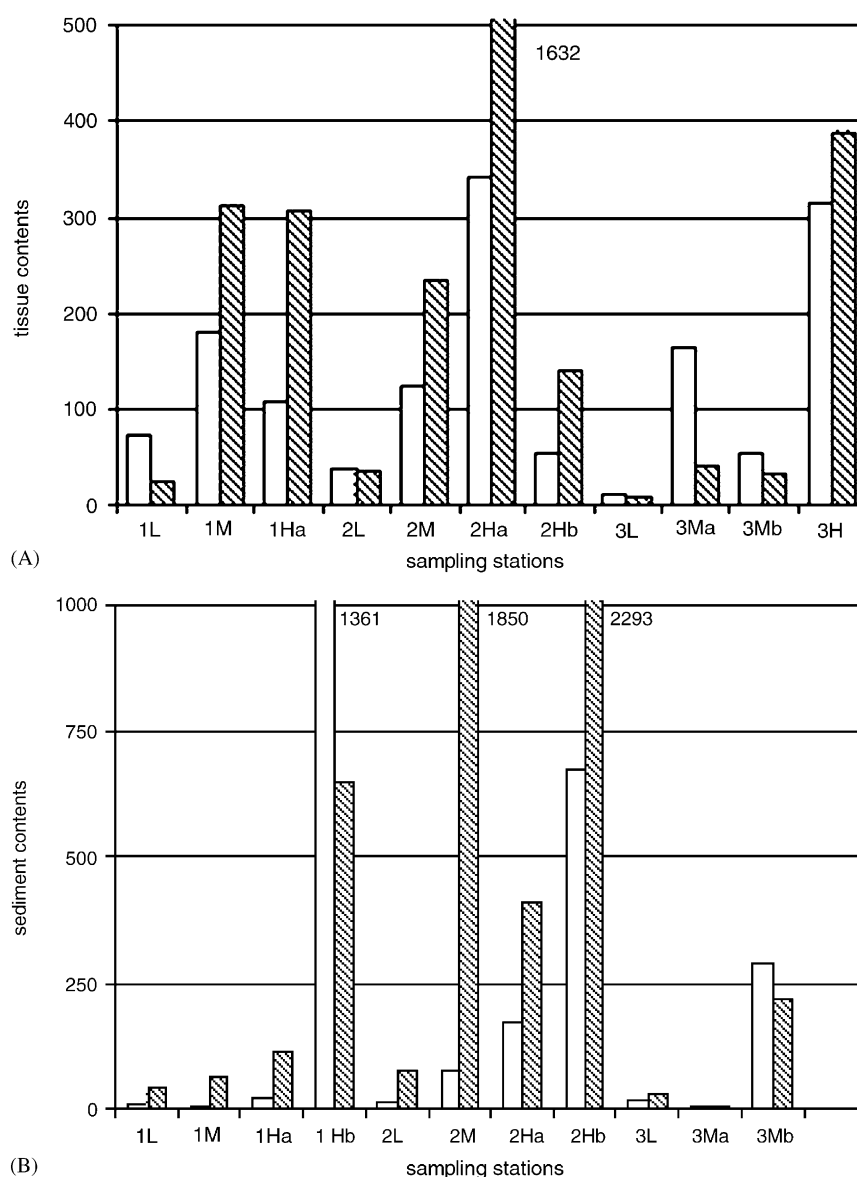


Fig. 3. Organic contaminant contents measured in mussel soft tissues (A) and in sediments (B) at the three sites monitored during this study. White bars, total PCBs; dark bars, total PAHs. Values are expressed in ng.10<sup>3</sup> g DW<sup>-1</sup> except for PAHs in sediments which were in ng.10<sup>2</sup> g DW<sup>-1</sup>. The sampling stations were located according to the main identified pollution sources to follow a suspected contamination gradient. H, hot spot; L, low pollution level; M, medium. Sublabels a and b indicate additional stations for a given pollution level.

### 3.3. Functional alteration: hemocyte immunocompetence parameters

For each individual, two complementary parameters were measured in hemocytes to explore possible alterations of the phagocytic function. In September 2001, both indexes (PI and PC) were simultaneously reduced at all French ( $P = 0.001$  and  $P < 0.001$ ) and Spanish ( $P = 0.08$  and  $P < 0.001$ ) polluted stations. The trend in effect intensity was in correlation with the gradient of contamination. However, these alterations were not found again the year after. In May 2001, the level of intracellular ROS production was severely reduced at several impacted stations at the three sites. This response was observed

again in September 2001 in France (1Ha,  $P = < 0.001$ ) and Italy (2M and 2Ha,  $P < 0.001$ ). In contrast, elevated ROS levels were measured at two polluted stations, in France (1Hb) and Spain (3Ma) ( $P < 0.001$ ).

### 3.4. Comprehensive analysis: integrated immunotoxicological index

A key step for the calculation of the immunotoxicological index was to obtain a reference value. This was achieved through a preliminary analysis where results obtained at all L stations were statistically compared to assess any seasonal or site effect. The results of this analysis have been summarized in Table 2. A clear seasonal effect

Table 1  
Average values for hemolymph parameters measured in mussels collected during four BEEP campaigns (A: BEEP 01 / May 2001; B: BEEP 02 / Sept 2001; C: BEEP 04 / Sept 2002; D: BEEP-05 / May 2003) in the sampling stations at the three sites (1: France; 2: Italy; 3: Spain)

Stations	Hemolymph parameters																								
	THC (10 <sup>6</sup> cells mL <sup>-1</sup> )			PRTS (mg mL <sup>-1</sup> serum)			ACPS (units mg <sup>-1</sup> PRTS)			MTH (ng mg <sup>-1</sup> PRTC)			NR (units mg <sup>-1</sup> PRTH)			PI (% positive cells)			PC (units)			ROS (units mg <sup>-1</sup> PRTH)			
	Mean	SD	<i>n</i>	Mean	SD	<i>n</i>	Mean	SD	<i>n</i>	Mean	SD	<i>n</i>	Mean	SD	<i>n</i>	Mean	SD	<i>n</i>	Mean	SD	<i>n</i>	Mean	SD	<i>n</i>	
(A)																									
1L	1.67	1.68	10	0.74	0.28	10	260	104	10	13.03	2.42	10	nd			nd			nd			1.04	0.63	10	
1M	3.23	1.68	10	0.83	0.40	10	266	139	10	14.53	3.85	8	nd			nd			nd			0.51	0.19	9	
1Ha	1.79	0.62	10	0.90	0.48	10	282	157	10	17.63	5.31	8	nd			nd			nd			0.52	0.18	10	
1Hb	2.33	1.33	10	0.82	0.51	7	355	318	7	13.30	2.99	9	nd			nd			nd			0.81	0.25	10	
<i>P</i> value		0.074 ●			0.86 ◆			0.99 ●			0.06 ◆											0.003 ●			
2L	1.51	0.93	10	1.00	0.38	10	226	101	10	4.41	1.34	10	nd			nd			nd			0.69 <sup>a</sup>	0.13	10	
2M	3.28	2.06	10	0.68	0.16	9	312	86	9	5.10	0.95	10	nd			nd			nd			0.47 <sup>b</sup>	0.14	10	
2Ha	1.84	1.29	10	0.88	0.48	9	306	102	9	6.68	4.10	10	nd			nd			nd			0.64 <sup>a</sup>	0.23	10	
2Hb	2.44	1.08	10	0.65	0.23	9	263	69	9	5.48	2.24	9	nd			nd			nd			0.43 <sup>b</sup>	0.17	10	
<i>P</i> value		0.07 ●			0.14 ●			0.15 ◆			0.44 ●											0.004 ◆			
3L	2.23 <sup>a</sup>	1.43	10	0.64	0.29 <sup>a</sup>	9	183 <sup>a</sup>	64	9	9.17	1.33	6	nd			nd			nd			0.81 <sup>a</sup>	0.12	10	
3Ma	2.32 <sup>a</sup>	1.75	10	1.42	0.40 <sup>c</sup>	10	141 <sup>a</sup>	40	10	10.97	3.79	10	nd			nd			nd			0.57 <sup>c</sup>	0.16	10	
3Mb	3.33 <sup>a</sup>	1.13	10	1.17	0.28 <sup>bc</sup>	10	199 <sup>bc</sup>	59	10	11.48	4.12	10	nd			nd			nd			0.69 <sup>b</sup>	0.13	10	
3H	5.60 <sup>b</sup>	2.14	10	1.01	0.31 <sup>b</sup>	9	246 <sup>c</sup>	86	9	19.51	9.76	10	nd			nd			nd			0.36 <sup>d</sup>	0.06	10	
<i>P</i> value		0.000 ◆			0.000 ◆			0.01 ◆			0.019 ●											0.000 ◆			
(B)																									
1L	1.66 <sup>a</sup>	1.40	9	0.66	0.33	9	87	20	9	5.23	0.46	3	nd			25.2 <sup>a</sup>	10.0	9	665	183	8	0.69	0.09	6	
1M	2.86 <sup>ab</sup>	1.32	10	1.04	0.35	10	65	47	10	5.75	1.68	8	nd			17.7 <sup>ab</sup>	8.9	10	432	35	10	0.81	0.35	10	
1Ha	3.32 <sup>b</sup>	1.69	9	1.77	0.93	9	64	35	9	5.96	1.95	6	nd			15.9 <sup>b</sup>	7.4	10	422	50	10	0.25	0.06	10	
1Hb	5.05 <sup>c</sup>	1.71	9	1.13	0.52	8	48	24	8	5.91	1.53	6	nd			8.3 <sup>c</sup>	5.5	10	403	29	10	1.24	0.10	8	
<i>P</i> value		0.001 ◆			0.012 ●			0.14 ◆			0.93 ◆						0.001 ◆			0.000 ●			0.000 ●		
2L	2.24	1.62	9	0.89	0.37	10	74	29	10	6.88	2.33	3	nd			11.9	4.7	10	445	44	10	0.90	0.18	10	
2M	2.16	1.80	10	0.71	0.26	10	97	30	10	4.40	1.11	4	nd			15.8	7.8	10	424	41	10	0.30	0.18	10	
2Ha	2.48	0.99	9	1.50	0.58	10	73	23	10	7.96	2.69	9	nd			16.6	8.1	10	496	94	10	0.55	0.07	9	
2Hb	2.29	0.92	10	0.65	0.12	10	67	9	10	8.33	0.75	3	nd			17.9	7.1	10	470	43	10	0.71	0.32	8	
<i>P</i> value		0.96 ◆			0.000 ●			0.063 ●			0.078 ◆						0.28 ◆			0.06 ●			0.000 ●		
3L	1.23	0.83	10	0.72	0.38	10	74	28	10	7.79 <sup>a</sup>	1.71	5	nd			22.1	6.5	10	505 <sup>a</sup>	74	10	0.17	0.12	7	
3Ma	2.41	1.25	10	0.77	0.24	10	68	21	10	7.81 <sup>a</sup>	1.55	9	nd			18.6	8.2	10	505 <sup>a</sup>	42	10	1.16	0.30	10	
3Mb	3.97	2.90	8	1.20	0.60	7	133	106	5	6.29 <sup>a</sup>	1.09	5	nd			20.7	13.5	8	377 <sup>b</sup>	54	8	0.47	0.13	8	
3H	5.60	3.34	10	1.09	0.31	10	83	35	9	9.72 <sup>b</sup>	1.70	8	nd			13.6	4.7	9	413 <sup>b</sup>	34	9	0.39	0.14	10	
<i>P</i> value		0.03 ●			0.025 ●			0.55 ●			0.06 ◆						0.08 ●			0.000 ◆			0.000 ●		
(C)																									
1L	0.58	0.26	10	0.92	0.24	10	35 <sup>a</sup>	21	10	nd			0.85 <sup>a</sup>	0.18	10	46.4	10.9	10	948	144	10	0.28	0.17	10	
1M	1.02	0.49	10	1.19	0.49	10	73 <sup>b</sup>	33	10	nd			0.85 <sup>a</sup>	0.12	10	39.7	8.8	10	773	236	10	0.22	0.15	9	
1Ha	2.93	1.00	9	1.06	0.32	10	74 <sup>b</sup>	40	10	nd			0.69 <sup>a</sup>	0.16	10	45.7	9.8	10	782	119	10	0.32	0.19	9	
1Hb	2.12	1.47	10	0.55	0.20	10	66 <sup>b</sup>	27	10	nd			1.09 <sup>b</sup>	0.27	10	42.8	11.2	10	911	138	10	0.29	0.15	9	
<i>P</i> value		0.000 ●			0.16 ●			0.024 ◆						0.000 ◆			0.50 ◆			0.043 ●			0.68 ◆		
2L	0.76	0.47	9	0.40 <sup>a</sup>	0.16	10	131	68	10	nd			0.75	0.29	10	34.5 <sup>ab</sup>	10.9	8	1102 <sup>a</sup>	177	8	0.30	0.12	10	
2M	1.01	0.50	10	1.08 <sup>b</sup>	0.33	10	54	17	10	nd			0.56	0.18	10	36.3 <sup>ab</sup>	8.9	10	717 <sup>b</sup>	113	10	0.23	0.16	10	
2Ha	0.85	0.31	10	0.90 <sup>b</sup>	0.27	10	99	46	10	nd			0.50	0.09	10	28.3 <sup>a</sup>	8.1	10	591 <sup>b</sup>	87	10	0.23	0.16	9	

Table 1 (continued)

Stations	Hemolymph parameters											
	THC (10 <sup>6</sup> cells mL <sup>-1</sup> )			PRTS (ng mL <sup>-1</sup> serum)			ACPS (units mg <sup>-1</sup> PRTS)			MTH (ng mg <sup>-1</sup> PRTC)		
	Mean	SD	n	Mean	SD	n	Mean	SD	n	Mean	SD	n
2Hb	1.00	0.51	10	0.89 <sup>b</sup>	0.26	9	73	0.001	9	nd	nd	9
P value	0.56	0.56	0.032	0.032	0.032	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
3L	1.41	0.69	8	0.54	0.28	10	124	72	10	nd	nd	10
3Ma	1.19	0.54	9	0.63	0.14	10	119	46	10	nd	nd	10
3Mb	0.69	0.56	8	0.60	0.18	10	101	71	10	nd	nd	10
3H	3.45	1.72	10	0.78	0.22	10	97	41	10	nd	nd	10
P value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.68	0.68	0.68	0.001	0.001	0.001
(D)												
3L	1.30	0.54	10	1.40	0.28	10	nd	nd	10	nd	nd	10
3Ma	1.69	0.99	10	0.29	0.07	10	nd	nd	10	nd	nd	10
3Mb	1.06	0.81	10	0.19	0.05	10	nd	nd	10	nd	nd	10
3H	1.84	1.38	10	0.28	0.05	10	nd	nd	10	nd	nd	10
P value	0.27	0.27	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Station labels are those used in the text. THC: total hemocyte counts, PRTS: total serum proteins, ACPS: serum acid phosphatase, MTH: hemocyte metallothioneins, NR: neutral red uptake, PI: phagocytic index, PC: phagocytic capacity, ROS: reactive oxygen species. The P value calculated from the data are indicated for each site (♦ : ANOVA, ● : Kruskal–Wallis). Means that share a letter were not different (ANOVA, confidence interval for 95%). SD = standard deviation; n = sample size; nd = no data.

Table 2

Probability levels generated by the statistical analysis of hemolymph parameters measured in mussel samples from the three low-impacted (L label in the text) stations during the BEEP campaigns

Immunological parameters	Season	Site
THC: total hemocyte counts	0.04	0.12
PRTS: total serum proteins	0.001	0.77
ACPS: serum acid phosphatase	0.000	0.45
PI: phagocytic index	0.08	0.004
PC: phagocytic capacity	0.008	0.10
ROS: reactive oxygen species	0.000	0.93

Data were obtained by ANOVA or Kruskal–Wallis analysis as described in the text.

( $P = 0.08$ ) was detected for most parameters, except for the phagocytic index. Conversely, this parameter alone had a significant site effect. These findings made it necessary to calculate a distinctive reference value for each site and sampling season, i.e., spring and autumn.

When the calculated values were examined, a gradient of index values vs. pollution intensity appeared in Spanish spring samples (Figs. 4A and B). At this site, the most impacted station (Barcelona harbor) had a very high index in 2001 (Fig. 4a). However, this value was due to a major contribution of the immunocompetence index. It is noticed that this value had been calculated only from ROS measurements (refer to Table 1A). In the other samples collected in spring, uneven variations were observed. Moreover, the fact that two of the L stations had zero value in 2001 prevented running any comprehensive analysis.

In autumn samples, increased index values were associated with high contamination levels, except in France in 2002 (Figs. 4C and D). A clear gradient evoking a dose–effect response appeared from stations L to stations H in 2001 in France and Spain (Fig. 4C). The relative contribution of the immunocompetence index was found particularly high there. In 2002, the values in Spain again followed a positive gradient (Fig. 4D). In Italy, no consistent pattern could be distinguish in any autumn sample. In 2001 and 2002, elevated indexes were calculated at all stations (Figs. 4C and D) whereas in spring 2001, one of the most polluted stations (2Ha) had the lower value at this site (Fig. 4A).

The relationship between the immunotoxicological index and the established pollution gradients has been statistically analyzed. In the present study, among seven sampling sessions (one per site and per campaign, please refer to Figs. 4A and B for France and Spain), only six trials could be considered for analysis, one (site 1/May 2001) being excluded because as mentioned above, the L station there had a zero value. The ranking for index values which fitted with the established gradient occurred five times among six trials: site 1 for Sept 2001 and site 3 for all campaigns. The calculated probability to obtain this score (or greater) in

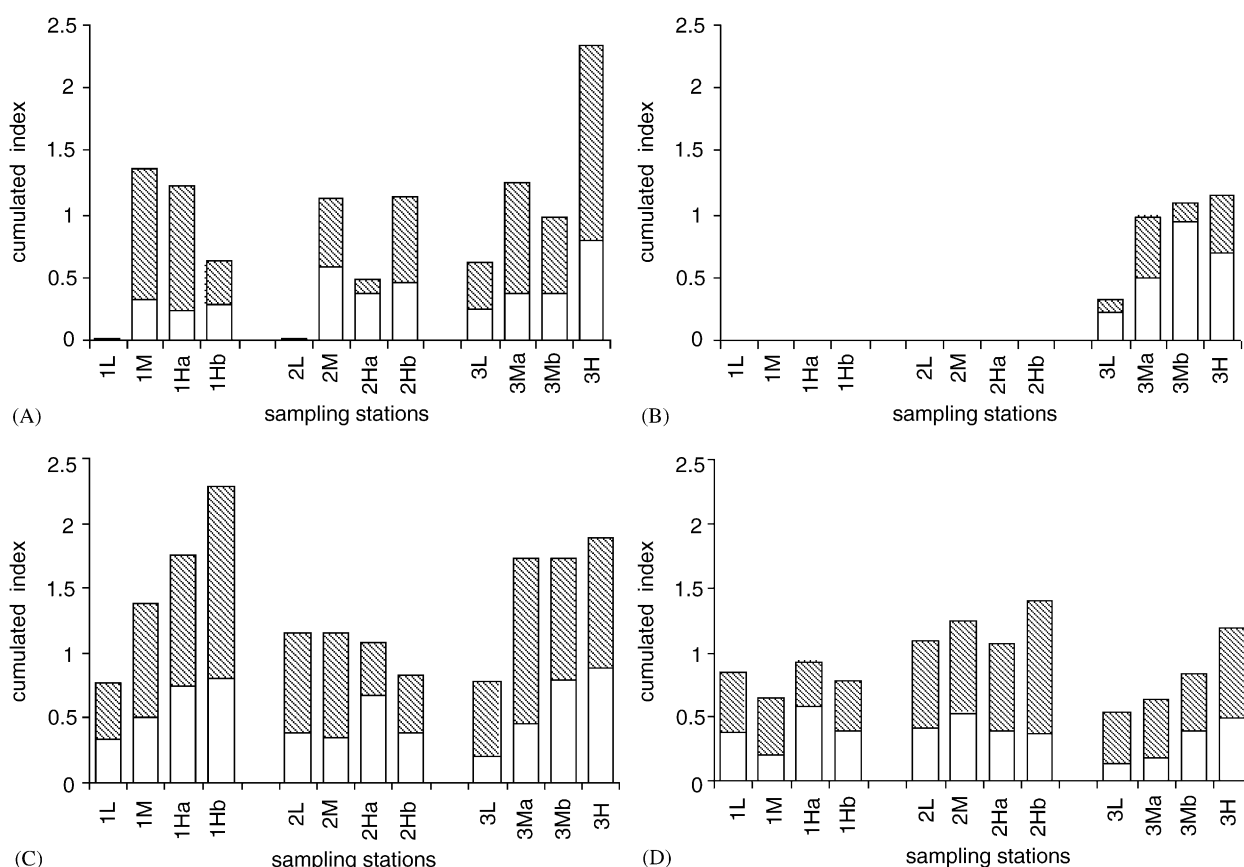


Fig. 4. Set of integrated immunotoxicological indexes calculated from immunological parameters measured from May 2001 to 2003 at the three sites. Values obtained for each of the two groups of parameters (immunopathology, white bars, hemocyte immunocompetence, dark bars) were cumulated for each station: (A) BEEP 01/May 2001; (B) BEEP-05/May 2003; (C) BEEP 02/September 2001; (D) BEEP 04/September 2002. The sampling stations were located according to the main identified pollution sources to follow a suspected contamination gradient. H, hot spot; L, low pollution level, M, medium. Sublabels a and b indicate additional stations for a given pollution level.

the case of independence between the index value and the pollution level was  $P = 0.00002$ . This very low value clearly indicated that the values of the immunotoxicological index and contamination levels along the expected gradients were linked.

#### 4. Discussion

The internal defense of bivalve mollusks appears a quite simple system based on innate mechanisms where cellular and humoral processes together insure cytotoxic and antimicrobial functions (Lorteau et al., 1995; Roch, 1999). Nevertheless, this system works with a complex organization of hemolymph cells—or hemocytes—and correct assessment of contamination may require examination of several complementary functions as recommended by Luster et al. (1989). Using bivalve mollusks as models, immunotoxicologists have to develop a full set of biological assays to make a diagnosis of immunosuppression (Auffret, 2005). To assess the immunological status of mussels and to detect possible alterations linked to contamination levels, the present multiparametric analysis had to include

different levels of physiological organization and biological significance. An overall hemolymph status of mussels was established by measuring immunopathological parameters reflecting both systemic changes in individuals and cellular damage.

##### 4.1. Immunological alterations in mussels

Changes in hemocyte counts and serum composition are among unspecific, early effects of physiological alterations which are classified as immunopathological parameters. During this 2-year survey, hemocyte counts greatly varied among sampling stations. The total cell counts were often increased in the polluted stations and a relationship with the expected gradient of contamination could be observed at the French and Spanish sites. Variations in hemolymph cellular composition, as total and differential counts, were among the first physiological disturbances described in bivalves exposed to environmental stressors (Anderson, 1988; Fisher, 1988). In mussels, exposure to heavy metals or hydrocarbons generated elevated circulating hemocyte numbers (Coles et al., 1994, 1995; Pipe et al., 1999). The



observed increase in circulating hemocytes at the polluted stations monitored here may indicate a chemical stress induced by environmental contamination. In bivalve mollusks, hemocytes normally associated with interstitial tissues would be transferred in circulation as a consequence of cell disturbance as a loss in adhesion properties (Auffret and Oubella, 1997). Such a phenomenon could explain this alteration of cell counts.

The serum fraction has been analyzed to obtain basic information on the (i) composition of the internal fluid, (ii) possible individual physiological alterations originating from environmental changes, and (iii) xenobiotic-induced cellular damage. Indeed, the amount of total proteins was regularly increased at the most polluted areas. This parameter is known to have a good short-term regulation capability in response to environmental stress such as osmotic shocks or to nutritional stress (Hand and Stickle, 1977; Thompson et al., 1978). Experimental chemical contamination of mussels resulted in release of proteins from hemocytes (Pickwell and Steinert, 1984). Consequently, under nonpathological conditions, alterations of protein levels could reflect severe tissue damage or metabolic disorders triggered by contamination. Since this parameter and variations of hemocyte numbers appeared to vary during the present survey in the same trend when contamination increased, it is suggested that the observed variations in total serum protein levels reflected early physiological alterations in mussel hemolymph. Individuals sampled in autumn appeared more responsive. The fact that several samples were missing may have obscured responses in spring. However, taking into consideration that reproductive cycles in bivalve mollusks induce changes in the biochemical composition of hemolymph (Thompson, 1977), it is recommended that only individuals sampled in the same period (i.e., season) and in a given geographical area should be compared for this parameter.

Cellular organelles such as lysosomes are sensitive targets of many environmental contaminants that induce various degrees of membrane destabilization, making lysosome diagnosis a promising approach for the development of key biomarkers (Allen and Moore, 2004). In mussels, lysosomal disruption is a degenerative process able to alter hemocyte functions such as phagocytosis (Grundy et al., 1996). Indeed, the NR uptake was decreased at most French and Spanish polluted areas, reflecting an alteration of the endocytic ability of hemocytes. These results are not in agreement with observations by Cajarville et al. (1996) of increased NR uptake in mussels sampled at a polluted site. However, these authors suggested that an enhancement of defense mechanisms such as endocytosis could have been triggered in a situation of moderate pollution. In experimental mussels, polycyclic aromatic hydrocarbons were found to reduce NR uptake (Grundy et al., 1996), whereas exposure to copper had no effect (Pipe et al., 1999). Indeed, in this study, areas contaminated by hydrocarbons such as 1Ha and 2M provided low values for this parameter.

The level of ACPS, a hydrolase possibly released in the case of lysosomal membrane disruption, was measured as a marker of severe cellular damage. In most cases however, this parameter displayed wide intersample variations with no correlation with pollution intensity. Finally, no established relationship appeared between these parameters although they were both expected to demonstrate membrane damage. A possible explanation for this is that the intensity of damage necessary to trigger ACPS release or NR uptake reduction requires a different threshold of contamination.

In addition to the deleterious effects of xenobiotics, the cellular stress level based on MT expression has been investigated in circulating hemolymph cells. These proteins are known as potential indicators of metal ion exposure and cellular detoxication processes (Roesijadi, 1994). Experimental exposure to heavy metal induced elevated MT levels in the digestive gland and gills of oysters (Boutet et al., 2002). In mussels exposed in situ to high concentrations of metals, Geffard et al. (2005) reported that MT synthesis may vary between tissues and seasons, the digestive gland being the most convenient matrix for MT determination. In the present study, high MT levels were measured in hemolymph cells from mussels collected in the hot spot at two sites. In Spain, the fact that MT induction did not occur in M stations is particularly meaningful since these sampling areas mostly received an organic contamination unlike that in Barcelona harbor where high tracemetal levels were measured by BEEP participants (see above). This clearly confirms that the toxicological profile of polluted sites is a determining factor when MT induction is used as a biomarker. Unclear differences arose when comparing M vs. L stations, suggesting that a background stress level in coastal waters could partially mask the effects of moderate levels of chemical contaminants. Actually, MTs may be induced by chemicals other than metals, especially those able to generate cellular oxidative stress (Klaassen et al., 1999). In addition, Isani et al. (2000) indicated that, in mollusks, the physiological state can affect the turnover of these proteins. It was also noticed in this study that mussels from H stations displayed a very variable response, possibly related to individual variability in populations. Further studies on MT gene polymorphism in mussels could clarify this point.

The capacity of hemocytes to adequately perform their role in internal defense against pathogens has been assessed by evaluating their immunocompetence. In laboratory experiments, chemical contamination impaired the phagocytic activity of clam hemocytes (Fournier et al., 2001). An inhibitory effect was also demonstrated in several species when hemocytes were incubated in vitro with metals (Auffret et al., 2002; Brousseau et al., 2000). In September 2001, both phagocytic indexes were reduced at French and Spanish polluted stations. The conspicuous correlation between these alterations indicated that the mussels there experienced a dramatic loss of defense capacity against pathogenic microorganisms. Reactive oxygen intermediates are produced by phagocytes upon challenge with

foreign particles (Badwey and Karnowsky, 1980). This microbicidal mechanism has been demonstrated in fish leucocytes (Sharp and Secombes, 1993) and invertebrate hemocytes (Adema et al., 1991; Anderson, 1994). Alteration in the production of those radicals has been demonstrated in oyster hemocytes exposed *in vitro* to organic pollutants (Anderson et al., 1997) or to heavy metals (Larson et al., 1989). In this study, decreased ROS levels were regularly observed but this response did not appear to be the rule at contaminated sites. Occasionally, the ROS level rose as a probable consequence of an excess of oxidant radicals in cells. Some oxidative stress may have occurred in hemolymph cells of these mussels. This could be confirmed by complementary measurements of oxidative damage in cells.

#### 4.2. Comparison of sites and campaigns

When data obtained from mussels collected during the 3 years of the survey in the three nonimpacted stations were compared, a seasonal effect in the variability of immunological parameters was indicated. Such findings in this species were mentioned by Beliaeff and Bocquené (2004) for acetylcholinesterase inhibition levels. As many biological functions of bivalve mollusks which undergo marked seasonal cycles, their immune status may also vary during the year (Auffret and Oubella, 1994; Oliver and Fisher, 1995). In addition, seasonal environmental factors were suspected to affect alterations of immunological parameters in response to contaminants in mussels and oysters (Pipe et al., 1995; Fisher et al., 2000). Among immune parameters measured in this study, changes in cell counts and phagocytosis-related mechanisms appeared to be the most affected. Observations of variable numbers of infiltrating hemocytes in interstitial tissues in mussels from the Atlantic coast of Spain were indicative that these cells could be involved in physiological functions other than immune defense (Cajaraville et al., 1996). Moreover, this parameter was found to vary on a seasonal basis. In bivalve mollusks, gametogenesis is probably one of the most demanding biological events with regard to tissue changes. Reporting seasonal changes in oyster immune characteristics, Fisher et al. (2000) warned that such variations might obscure pollutant related differences among sampling sites. Recent data in fish on the incidence of pollution effects depending on sex have revealed differences in metabolic responses (Koehler and Van Noorden, 2003). In bivalve mollusks, the observation that pollution altered the seasonal pattern clearly indicates that natural cycles have to be considered in sentinel species. Further work is needed to investigate how sex-related differences but also, in a more general approach, all metabolic changes could affect immunological biomarkers.

Another outcome of this long-term study is the observation of a site effect which indicated that mussels from different parts of Western Mediterranean were biologically different. Local environmental conditions

may be suspected rather than populational differences since Daguin et al. (2001) stated that no genetic differentiation occurred in Mediterranean mussel populations. Consequently, a site-per-site data processing was required here and a lightly contaminated station was systematically included in each area to draw near to reference conditions. This approach allowed establishment of within-site comparisons and validation of immunotoxicological alterations as biomarkers in these mussel populations.

#### 4.3. Integrated immunotoxicological index: comparison of sites

The parameter-by-parameter analysis discussed above has allowed correlation of immunopathological and functional alterations corresponding to immunosuppressive conditions with high levels of exposure. At that point, any comprehensive analysis remains hard to achieve for at least two reasons. First, each mussel sample has provided between five and seven biological parameters as reported in Table 1. Second, as for most physiological functions, immune parameters may be enhanced or depressed in response to stressful conditions (Luster et al., 1989). This situation was experienced by Oliver et al. (2001) and Fisher et al. (2003) who reported stimulated defence factors in oysters collected from polluted sites. In bivalve mollusks, functions linked to phagocytosis (internalization, respiratory burst) particularly appear to follow this rule (Auffret, 2005). In an attempt to increase the ecophysiological significance of this multiparameter study, a comprehensive approach recently proposed by Auffret et al. (2004) was applied and adapted to the actual set of data. For that purpose, an immunotoxicological index was calculated for each sampling station. The calculation of this index integrated both trends of parameter variations: depression and stimulation. Reference values per site and per sampling period (spring and autumn) were obtained from samples exposed to the minimal pollution level (L stations) considering that, as mentioned above, a natural immunological variability occurred among populations and seasons.

When values obtained during this study were examined with regard to each pollution gradient, the discriminating power of this index was clearly demonstrated at the Spanish site. Indeed, Barcelona harbor regularly displayed the higher value, compatible with heavy pollution originating from shipping and industrial activities. The lower value was always obtained in the L station. The uneven index levels observed near the Ebro delta may reflect a chronic contamination generated in this river by intensive agriculture.

In France, the 2001 autumn sample provided a conspicuous index profile with high values for all contaminated stations. In spring 2001, two of those (1M and 1Ha) had comparable high indexes. These stations were localized, respectively, near the delta of the Rhône river which receives industrial sewage and close to huge petrochemical plants. However, no real distinction among



these stations arose from the chemical data provided by BEEP participants. It is noted that the 1Hb station had a distinct toxic potential due to urban sewage.

In contrast, this study did not discriminate among Italian stations. Actually, it appeared that no gradient emerged from the chemical analysis of tissues and sediment there. Because a comparable response pattern was observed in 2001 and 2002, it is suggested that more complex environmental conditions affecting the impact of contaminants on mussel populations occurred at this Italian site.

## 5. Conclusions

Results obtained after this 2-year survey demonstrate that measurable cellular changes could be detected in the immune system of mussels collected from several polluted areas. Especially, immunopathological alterations such as hemocyte counts in hemolymph and cell membrane integrity were found correlated with contamination levels. Among functional parameters, those assessing the phagocytic and antimicrobial capacities of hemocytes appeared interesting discriminant tools. In view of the biological meaning of these alterations, individuals from several polluted stations could be considered to suffer immunotoxic effects. However, it should be noticed that all parameters measured here did not always respond simultaneously. A differential threshold to trigger these various responses should be suspected. These considerations emphasize the need to run a set of parameters in a multiparametric analysis to establish a pertinent immune diagnosis for the individuals. By providing a single value per site (i.e., each mussel sample), the calculation of an integrated immunotoxicological index allowed recognition of a gradient of perturbation correlated to the actual pollution gradient at two sites. However, this profile appeared inconstant at the French site. It is suggested that further studies focus on temporal variations of immune parameters in model species over a pluriannual period at sites selected for contrasted profiling of the chemical environment. This approach could enhance the potential of bivalve immunotoxicology to provide ecotoxicology with operational effect biomarkers.

## Acknowledgments

This study has been funded through the BEEP research project “Biological Effects of Environmental Pollutants in Marine Ecosystems—EVK3-CT2000-00025” (<http://beep.lptc.u-bordeaux.fr>) which was supported by the European Commission under the Environment and Sustainable Development Programme. The sampling campaigns were operated through the Mediterranean portion of the project (WP3) with the oceanographic vessel “L’Europe” of the French Institute IFREMER. The authors thank Alain Marhic, Nedžad Mujdzic, and Louis Quiniou for their technical support. Jean-François Chiffolleau and Hélène Budzinski kindly provided unpublished data for

contaminants. Discussions with Benoît Beliaeff and Gilles Bocquené about data management have been much appreciated. We also thank Michel Fournier (INRS-IAF, Canada) for advice on the manuscript.

## References

- Adema, C.M., Van der Knaap, W.P.W., Sminia, T., 1991. Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Rev. Aquat. Sci.* 4, 201–223.
- Allen, J.I., Moore, M.N., 2004. Environmental prognostics: is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? *Mar. Environ. Res.* 58, 227–237.
- Anderson, R.S., 1988. Effects of anthropogenic agents on bivalve cellular and humoral defense mechanisms. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18, 238–242.
- Anderson, R.S., 1994. Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve molluscs. *Dev. Comp. Immunol.* 18, 89–96.
- Anderson, R.S., Olivier, L.M., Jacobs, D., 1992. Immunotoxicity of cadmium for the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin, 1791): effects on haemocyte chemiluminescence. *J. Shellfish Res.* 11, 31–35.
- Anderson, R.S., Brubacher, L.L., Ragone Calvo, L.M., Bureson, E.M., Unger, M.A., 1997. Effect of in vivo exposure to tributyltin on generation of oxygen metabolites by oyster hemocytes. *Environ. Res.* 74, 84–90.
- Auffret, M., 2005. Bivalves as models for marine immunotoxicology. In: Tryphonas, H., Fournier, M., Blakley, B.R., Brousseau, P., Smits, J. (Eds.), *Investigative Immunotoxicology*. CRC Press, Boca Raton, pp. 29–48.
- Auffret, M., Oubella, R., 1994. Cytometric parameters of bivalve molluscs: effect of environmental factors. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C. (Eds.), *Modulators of Fish Immune Responses*. SOS Publications, Fair Haven, pp. 23–32.
- Auffret, M., Oubella, R., 1995. Cytology and cytometric analysis of bivalve mollusc hemocytes. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Smith, S.A., Zelikoff, J.T., Kaatari, S.L., Anderson, R.S., Söderhäll, K., Weeks-Perkins, B.A. (Eds.), *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications, Fair Haven, pp. 55–64.
- Auffret, M., Oubella, R., 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: in vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A (31), 705–712.
- Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D., 2002. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster. *Mar. Environ. Res.* 54, 585–589.
- Auffret, M., Duchemin, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., Marhic, A., 2004. Monitoring of immunotoxic responses in oysters reared in areas contaminated by the “Erika” oil spill. *Aquat. Living Resour.* 17, 297–302.
- Badwey, J.A., Karnowsky, M.L., 1980. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 695–726.
- Beliaeff, B., Bocquené, G., 2004. Exploratory data analysis of the Mediterranean component of the BEEP programme. *Mar. Environ. Res.* 58, 239–244.
- Bernier, J., Brousseau, P., Krzystyniak, K., Tryphonas, H., Fournier, M., 1995. Immunotoxicity of heavy metals in relation to great lakes. *Environ. Health Perspect.* 103, 23–34.
- Boutet, I., Tanguy, A., Auffret, M., Riso, R., Moraga, D., 2002. Immunochemical quantification of metallothioneins in marine molluscs: characterization of a metal exposure bioindicator. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1009–1014.
- Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Fournier, M., 2000. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. *Toxicology* 142, 145–156.
- Burchiel, S.W., Kerkvliet, N.L., Gerberick, G.F., Lawrence, D.A., Ladics, G.S., 1997. Assessment of immunotoxicity by multiparameter flow cytometry. *Fundam. Appl. Toxicol.* 38, 38–54.

- Cajaraville, M.P., Olobarrieta, I., Marigomez, I., 1996. In vitro activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: a case study in the Abra estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 253–260.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311.
- Coles, J.A., Farley, S.R., Pipe, R.K., 1994. The effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 30, 367–379.
- Coles, J.A., Farley, S.R., Pipe, R.K., 1995. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Dis. Aquat. Org.* 22, 59–65.
- Daguin, C., Bonhomme, F., Borsa, P., 2001. The zone of sympatry and hybridization of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*, as described by intron length polymorphism at locus mac-1. *Heredity* 86, 342–354.
- Depledge, M.H., 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Fossi, M.C., Leonzio, C. (Eds.), *Non Destructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, pp. 271–295.
- Fisher, W.S., 1988. Environmental influence on host response: environmental influence on bivalve hemocyte function. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18, 225–237.
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Long, E.R., 2000. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquat. Toxicol.* 51, 115–138.
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Volety, A.K., 2003. Stimulation of defense factors for oysters deployed to contaminated sites in Pensacola Bay, Florida. *Aquat. Toxicol.* 64, 375–391.
- Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y., Brousseau, P., 2001. Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 161, 201–211.
- Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., 2005. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 209–220.
- Grundy, M.M., Moore, M.N., Howell, S.M., Ratcliffe, N.A., 1996. Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 34, 273–290.
- Gunther, A.J., Davis, J.A., Hardin, D.D., Gold, J., Bell, D., Crick, J.R., Scelfo, G.M., Sericano, J., Stephenson, M., 1999. Long-term bioaccumulation monitoring with transplanted bivalves in the San Francisco estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 170–181.
- Hand, S.C., Stickle, W.B., 1977. Effects of tidal fluctuations of salinity on pericardial fluid composition of the American Oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 42, 259–271.
- Isani, G., Andreani, G., Kindt, M., Carpena, E., 2000. Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. *Cell Mol. Biol.* 46, 311–330.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S., 1999. Metallothioneins: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267–294.
- Koehler, A., Van Noorden, C.J.F., 2003. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and the higher incidence of pollution-induced liver cancer in female flounder. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2703–2710.
- Larson, K.G., Roberson, B.S., Hetrick, F.M., 1989. Effects on environmental pollutants on the chemiluminescence of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica*. *Dis. Aquat. Org.* 6, 131–136.
- Lorteau, C., Auffret, M., Le Bris, H., 1995. Le système d'immunodéfense des Mollusques bivalves. I. Structure et fonctionnement. *Rec. Méd. Vét.* 171, 415–422.
- Luster, M.L., Ackermann, M.F., Germolec, D.R., Rosenthal, G.J., 1989. Perturbations of the immune system by xenobiotics. *Environ. Health Perspect.* 81, 157–162.
- Oliver, L.M., Fisher, W.S., 1995. Comparative form and function of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes from Chesapeake Bay (Virginia) and Apalachicola Bay (Florida). *Dis. Aquat. Org.* 22, 217–225.
- Oliver, L.M., Fisher, W.S., Winstead, J.T., Hemmer, B.L., Long, E.R., 2001. Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. *Aquat. Toxicol.* 55, 203–222.
- Phillips, D.J.H., 1995. The chemistries and environmental fates of trace metals and organochlorines in aquatic ecosystems. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 193–200.
- Pickwell, G.V., Steinert, S.A., 1984. Serum biochemical and cellular responses to experimental cupric ion challenge in mussels. *Mar. Environ. Res.* 14, 245–265.
- Pipe, R.K., 1995. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Smith, S.A., Zelikoff, J.T., Kaatari, S.L., Anderson, R.S., Söderhäll, K., Weeks-Perkins, B.A. (Eds.), *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications, Fair Haven, pp. 93–100.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve mollusks. *Fish Shellfish Immunol.* 5, 581–595.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., Thomas, M.E., Fossato, V.U., Pulsford, A.L., 1995. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. *Aquat. Toxicol.* 32, 59–73.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., Carissan, F.M.M., Ramanathan, K., 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 46, 43–54.
- Roch, P., 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172, 125–145.
- Roesijadi, G., 1994. Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic organisms. *Environ. Health Perspect.* 102, 91–95.
- Sharp, G.J.E., Secombes, C.J., 1993. The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* 3, 119–129.
- Thompson, R.J., 1977. Blood chemistry, biochemical composition and the annual reproductive cycle in the giant scallop, *Placopecten magellanicus*, from the southeast Newfoundland. *J. Fish. Res. Board Can.* 37, 2104–2116.
- Thompson, R.J., Bayne, C.J., Moore, M.N., Carefoot, T.H., 1978. Haemolymph volume, changes in the biochemical composition of the blood, and cytological responses of the digestive cells in *Mytilus californianus* Conrad, induced by nutritional, thermal and exposure stress. *J. Comp. Physiol.* 127, 287–298.
- Voccia, I., Krzystyniak, K., Dunier, M., Flipo, D., Fournier, M., 1994. In vitro mercury-related cytotoxicity and functional impairment of the immune cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 29, 37–48.
- Zatta, P., Gobbo, S., Rocco, P., Perazzolo, M., Favaro, M., 1992. Evaluation of heavy metal pollution in the venetian lagoon by using *Mytilus galloprovincialis* as biological indicator. *Sci. Total Environ.* 119, 29–41.
- Zeeman, M., 1996. Comparative immunotoxicology and risk assessment. In: Stolen, J.S., Zelikoff, J.T., Twerdok, L., Bayne, C., Fletcher, T.C., Hefti, E., Secombes, C., Anderson, D.P., Kaatari, S. (Eds.), *Modulators of Immune Responses*. SOS Publications, Fair Haven, pp. 317–329.

## VII. Synthèse

Ce chapitre visait à établir une base méthodologique pour la validation des outils immunotoxicologiques pour l'étude du risque chimique environnemental en milieu marin.

Les comparaisons de techniques et de méthodes d'évaluation des paramètres immunitaires entrepris dans la section II ont mis en évidence l'importance critique du site de prélèvement des hémocytes pour le diagnostic immunotoxique, certainement liés à des patterns hémocytaires différents. Les ateliers internationaux d'harmonisation dont les résultats sont présentés dans la section III ont permis de définir un protocole d'analyse, par cytométrie en flux et en microplaque, adapté à l'évaluation environnementale individuelle de grandes populations. Ces résultats pourront être utilisés dans l'évaluation environnementale de plusieurs sites ateliers proposés par le Réseau Atlantique Bivalves.

La nécessité de procéder à des études individuelles de toxicité sur le système immunitaire de bivalves de condition physiologique initiale connue, a motivé les travaux de la section IV et V. Le protocole d'exposition, « in tubo », offre ainsi des conditions d'exposition individuelle standardisées, la possibilité de mesurer un indicateur de suivi expérimental, l'activité de filtration tout en réduisant le risque chimique pour l'utilisateur. Ce protocole est une alternative aux tests *in vivo* et *in vitro* adapté à l'évaluation du risque environnemental en milieu marin côtier.

Les résultats présentés dans la section VI rendent compte du développement et de l'utilisation opérationnel d'un indice cumulé immutotoxicologique et permet un diagnostic global du risque chimique environnemental d'un site d'intérêt ou d'une substance chimique.

Dans le chapitre suivant, sera étudié l'impact de facteurs autres que chimiques sur les outils immunotoxicologiques chez les bivalves.

# *Chapitre 4.*

## *Impact des facteurs saisonniers et endogènes*

---

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>165</b>
<b>II. ÉTUDE DES VARIATIONS SAISONNIERES DES PARAMETRES IMMUNITAIRE EN FONCTION DU SEXE, DU STADE DE MATURATION ET DE LA PLOÏDIE CHEZ L’HUITRE CREUSE, CRASSOSTREA GIGAS</b>	<b>166</b>
<b>III. IMPACT DE LA REPRODUCTION ET DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX SUR LES VARIATIONS SAISONNIERES DES PARAMETRES IMMUNITAIRES CHEZ LA MOULE, MYTILUS EDULIS</b>	<b>182</b>
<b>IV. VALEURS SYNTHETIQUES DES PARAMETRES IMMUNITAIRES CHEZ LES BIVALVES</b>	<b>195</b>
<b>V. SYNTHÈSE</b>	<b>197</b>



## 1. Introduction

L'étude des effets toxiques de substances chimiques sur le système immunitaire a permis l'émergence de nouvelles questions, notamment en ce qui concerne les interactions entre le système immunitaire et les autres fonctions physiologiques (Woolhiser *et al.*, 2005). Chez les rongeurs ou les pinnipèdes, les effets immunotoxiques du chlorure de mercure diffèrent selon le sexe. Chez les invertébrés, les paramètres immunitaires, en dehors de tout contexte de perturbation chimique, peuvent varier au cours des mois (Auffret et Oubella, 1997; Petrovic *et al.*, 2004; Lemaire *et al.*). L'hypothèse de l'implication de facteurs endogènes, comme la période de ponte des bivalves (Cartier *et al.*, 2004; Soudant *et al.*, 2004; Cho et Jeong, 2005) a été avancée mais n'a pas pu être clairement démontrée faute de suivi du cycle reproducteur ou de données individuelles. Des facteurs exogènes, comme la température, la qualité nutritive ou encore la perturbation mécanique, étudiés en tant que stress aigue, peuvent aussi moduler les paramètres immunitaires chez l'huître creuse, l'huître de Virginie ou la palourde japonaise (Ballarin *et al.*, 2003; Delaporte *et al.*, 2003; Hégaret *et al.*, 2003a, 2003b; Hégaret *et al.*, 2004; Delaporte *et al.*, 2005). Néanmoins, dans ce travail dont l'ambition est d'étudier les paramètres immunitaires dans des conditions adaptées aux conditions environnementales des bivalves, il était indispensable d'observer les variations saisonnières des paramètres immunitaires en même temps que les paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau. Ainsi, ce chapitre sera divisé en deux parties. L'étude de l'impact de la reproduction sur les paramètres immunitaires sera d'abord réalisée chez l'huître creuse en comparant deux lots d'individus n'ayant pas la même ploïdie. Ensuite, l'impact des paramètres physico-chimiques du milieu sera étudié chez une espèce qui n'a pas le même cycle reproducteur, la moule.

**II. Étude des variations saisonnières des paramètres immunitaire en fonction du sexe, du stade de maturation et de la ploïdie chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas***

## Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg)

Article accepté à Aquaculture (2007)

Matthieu B. Duchemin<sup>1,2,✉</sup>, Michel Fournier<sup>2</sup>, Michel Auffret<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des sciences de l'environnement marin, UMR CNRS 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, place Nicolas Copernic, 29 280 Plouzane – France

<sup>2</sup>Institut Armand Frappier, Institut National de la Recherche Scientifique, Campus Pointe-Claire, 245 Hymus, Pointe-Claire, 9R 1G6, Quebec – Canada

✉tel: +33(0)298498677 fax : +33(0)298498645 email : [matthieu.duchemin@univ-brest.fr](mailto:matthieu.duchemin@univ-brest.fr)

### Abstract

During the last two decades, knowledge of shellfish immunology has been largely improved and the immune status of bivalves can be assessed by the measurement of both cellular and humoral parameters. Previous monitoring studies which the immune status of bivalve molluscs has been assessed have demonstrated that many parameters may vary greatly among sites and seasons, suggesting that environmental and endogenous factors may affect this system. Reproduction may also interfere with the immune system. This study focuses on the seasonal variations of the immune parameters in two batches of Pacific oysters differing by their ploidy, diploid's and triploid's. The oysters were sampled from a French oyster farm over two reproductive periods. Selected immune parameters investigating haemocyte integrity and immunocompetency were analysed monthly by flow cytometry. Histological observations were made in gonads to discriminate gender and gametogenesis stages. Results indicate that immune parameters in both diploid and triploid oysters exhibited marked seasonal variations. Phagocytosis index was significantly low during spawning before reaching a maximum in autumn. Triploids also appeared to be less sensitive to environmental cues than diploids. Taken as a whole, alterations observed in maturing individuals corresponded to a depressed immune status in late spring, at a time corresponding to the spawning period. Furthermore, grouping by sex of ongoing gametogenesis individuals revealed uneven immune alterations among males and females. Finally, grouping sexual maturation stages showed evidence of a peculiar stressful event during early gametogenesis, perhaps under endogenous control.



*Keywords*

Immune defence; Flow cytometry; Reproduction; Phagocytosis; Haemocyte; Triploid; *Crassostrea gigas*

## 1. Introduction

The production of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is the highest in global and French shellfish production (FAO, 2003). Oysters are reared on coastal producing sites and therefore are exposed to seasonal environmental changes throughout the annual cycle. Natural individuals are diploids but triploids' production has been introduced in aquaculture in the two last decades in order to enhance growth versus reproduction in fish and in shellfish. The reproductive cycles of diploids and triploids differs largely. Many comparative studies have hence been performed on growth enhancement, reproduction (Allen et Downing, 1990), and feeding performance (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2001a; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2001b). However no converging results have been published on the efficiency of the immune system towards pathogens (Nell, 2002). Furthermore no literature exists on the comparison of the immune parameters of triploids and diploids.

The immune system of shellfish and molluscs has been studied in many bivalve species of economic value such as clams (Fournier *et al.*, 2001; Ballarin *et al.*, 2003; Soudant *et al.*, 2004), mussels (Pipe *et al.*, 1995b; Cartier *et al.*, 2004) and oysters (Auffret et Oubella, 1995; Lambert *et al.*, 2003; Goedken et De Guise, 2004). It is an innate immune system composed of specific cells, the haemocytes (Auffret, 1988) and some humoral effectors (Mitta *et al.*, 2000) in the circulating fluid, the haemolymph. As the circulatory apparatus is semi open to the media, the physical and chemical parameters of the water column interferes with the physical and chemical parameters of the haemolymph and various external agents may enter the organism (Hine, 1999). The status of the immune system can be estimated by assessing a number of immune parameters which indicates whether the components of the immune system are structurally (number of haemocytes, haemocytes' mortality, aggregation) capable of performing immune functions (phagocytosis, lysosomal system, oxidative burst) efficiently (Auffret, 2005). Many studies have shown that this multiparametric approach can discriminate different polluted or rearing sites (Auffret *et al.*, 2004; Soudant *et al.*, 2004; Auffret *et al.*, 2006). Laboratory studies have revealed that these parameters can be modulated by chemicals (Pipe *et al.*, 1999; Fournier *et al.*, 2001; Fournier *et al.*, 2002). But knowledge on natural seasonal variations of immune parameters is still lacking (Petrovic *et al.*, 2004; Leinio et Lehtonen, 2005) and is needed to better understand biological critical periods of local species. A further deficiency is the absence of data of factors, like age, sex, gametogenic status, nutrition, which can be considered as confounding factors interfering with the immune system and which may induce the high inter individual variability observed in Bivalve

statistical populations (Selgrade, 1999; Galloway et Depledge, 2001; Auffret, 2005; Selgrade, 2005). Seasonal variations of biological parameters have two origins: exogenous and endogenous. Firstly, exogenous factors such as temperature and salinity (Gagnaire *et al.*, ; Hégaret *et al.*, 2003a, 2003b; Gagnaire *et al.*, 2006a), pH, carbonates, amount and quality of feeding particles (Delaporte *et al.*, 2003; Hégaret *et al.*, 2004; Delaporte *et al.*, 2005) or bacteria or viral concentration (Paillard *et al.*, 2004), modulate structurally and functionally the immune system of bivalves. Secondly, there is increasing evidence that the immune status of molluscs is influenced by annual reproductive cycles. Hemocyte migration toward interstitial tissues and finally, gonadic follicles, has been extensively observed during gamete atresy (Cajaraville *et al.*, 1996b). This phenomenon leads to variations in circulating haemocyte counts. Other interactions may arise from molecular regulation pathways. Indeed, neuro-endocrino-immunology is by far a less documented field of knowledge. The occurrence of hormonal receptors in haemocytes has been recently observed (Canesi *et al.*, 2004a). Furthermore, alterations of haemocyte functions appear to be modulated in mussels exposed to endocrine disruptors depending on gender (unpublished data).

Therefore the aim of this study was to compare the annual pattern of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), and the role of the reproductive cycle (sex and gametogenic status) on this pattern, considering triploids as altered-reproduction treated individuals.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Animal handling*

Diploid and triploid Pacific oysters from the farm “Huîtrerie de la pointe du château”, (Belon, Brittany, France) were reared according to local techniques, pouches full of oysters of similar age were fixed on tables on the foreshore. Diploid spat had been collected in the South-West of France (Gujan-Mestras) and were settled at the farm in April 2002. The triploid spat had been produced by the company SATMAR and triploidy was checked to be over 99% successful. Triploids were settled at the farm in November 2002. For 15 months, from May 2003 to August 2004, 10 diploids and 10 triploids, of same age, were sampled monthly, the same day, and transported in an algae-moisturised cool box to the laboratory. In November 2003 oysters were not sampled. Until haemolymph processing, oysters were stored for no more than 15 hours in a thermo-regulated chamber, the cool box at a temperature of 10°C.

## 2.2. Haemolymph sampling

Haemolymph was withdrawn from the anterior adductor muscle sinus with a 2ml syringe and a 21G needle. We collected 1ml haemolymph from each individual into 1.5ml plastic tube, after filtering (80  $\mu\text{m}$ ), and stored on ice before analysis. Samples were examined under a microscope (1 drop on a glass slide) to ensure the absence of parasites, aggregates or neoplasia. All analysis was performed individually.

## 2.3. Total haemocyte count (THC)

THC was performed by flow cytometry (FACSCalibur® Becton Dickinson) from haemocyte suspensions. The flow cytometer was operated with PBS (400 mOsm.kg<sup>-1</sup>) as sheath fluid. The flow rate was measured to allow absolute cell counts (Auffret *et al.*, 2006). The results were expressed as the number of cells per millilitre.

## 2.4. Haemocyte mortality

In a 5 ml Falcon® tube, 50 $\mu\text{l}$  of individual haemolymph was poured into 250 $\mu\text{l}$  of anti-aggregating solution for haemocytes (pH = 6.7; Osmolarity = 920 mOsm) as described by Auffret and Oubella (1995). Propidium iodide (PI) is impermeable to the membranes of live cells. Therefore PI is excluded from viable cells and fluoresces in the red when bound to DNA. PI was added to a final concentration of 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  and tubes were incubated for 10 min at 4°C in the dark before flow cytometry analysis (FacsCalibur®, Becton-Dickinson). The fluorescence was read with CellQuest® (Becton-Dickinson) software. The percentage of haemocytes that had incorporated propidium iodide was the haemocyte mortality.

## 2.5. Phagocytic index

This major function parameter was assessed *in vitro* from Brousseau *et al* (1998) and was modified as followed. We pipetted 100 $\mu\text{l}$  of each individual haemolymph into a well of a 96-well microplate. Then, haemocytes were put into contact with a solution of 2  $\mu\text{M}$  fluorescent latex beads (Polyscience®, GmbH) according to a beads:haemocytes ratio of 30:1. After gentle centrifugation (4°C, 300 g, 10 min.), the microplate was incubated for 4 hours at 15°C in the dark. EDTA-saline buffer complemented with trypsin (0.5g.L<sup>-1</sup>) was finally added to each well and the microplate was agitated for 5 min. The content of each well was then transferred into cytometry tubes before flow cytometry analysis (FacsCalibur®, Becton-

Dickinson). Each well was visually assessed during this operation to avoid cell loss due to adherence (Auffret *et al.*, 2004; Auffret *et al.*, 2006). An index of all the phagocytosing haemocytes (phagocytic index) was calculated by the CellQuest software™ from the histogram of relative fluorescence intensity distribution as the geometric mean of values provided by cells having engulfed at least three beads (Lehmann *et al.*, 2000). The results were expressed in arbitrary units.

## 2.6. Sex and sexual maturation determination

As sex and maturation stages could be an important source of individual variations they are important factors to be considered. Histological observation was used on individuals sampled from May 2004 to August 2004. Gonadal tissue was sampled posterior to the pericardic sinus and put in Bouin's fixative solution for 48h. Gonad samples were then dehydrated and embedded in paraffin® through an automatic carousel. Sections of 5 µm were cut from the samples and put on slides. Haematoxylin-eosin coloration was used to observe germinal structures. Sex and sexual maturation were defined according to the commonly used five-stage classification (Lubet, 1959; Gosling, 2003) as follows: (0), resting period; (1), initiation of gametogenesis; (2), gonadal maturation stage; (3), final maturation stage; (4), spawning stage.

## 2.7. Statistical analysis

Dot plots of the 255 observations were first used to exclude extreme data (10 to 100 fold higher than other data). The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify the normal distribution of the values. In case of abnormality, the values were Log-transformed in order to meet the assumptions for parametric tests (Sokal et Rohlf, 1995). Firstly, a t-test was performed on the immune parameters in order to compare the duplicated months. Then, an ANOVA 2 (month and cytogenetic status) was realised to compare the differences between each groups. An analysis of variance was finally performed on the data to test the effect of sex, then sexual maturation stages, on the immune parameters. For each test, an Honest Significant Difference's Tukey test was performed as a *post hoc* test. Each test was realised with  $p = 0.05$ . For all parameters, since no significant difference ( $p > 0.05$ ) was observed between duplicated months it was decided to combine them for further data processing and statistical analysis. Finally results are presented throughout a year from January to December, but November.

### 3. Results

#### 3.1. Immunopathology variations

THC varied along the sampling period in diploid individuals. The values varied between a minimum (below  $0.5 \times 10^6$  cell.ml<sup>-1</sup>), during winter months, and a non significant maximum in May ( $1.3 \times 10^6 \pm 9.6 \times 10^5$  cell.ml<sup>-1</sup>; N = 28). Values remained high during summer. A significant isolated peak value was observed in March ( $1.6 \times 10^6 \pm 1.2 \times 10^6$  cell.ml<sup>-1</sup>; N = 10). From May to September, THC values remained constant ( $9.3 \times 10^5 \pm 7.1 \times 10^5$  cell.ml<sup>-1</sup>; N = 73) with high individual variations before decreasing ( $5.7 \times 10^5 \pm 5.0 \times 10^5$  cell.ml<sup>-1</sup>; N = 10) in October (fig. 32A).

In triploid oysters, values were less varying and individual variations were reduced compared to diploids but still higher in summer than in winter. Furthermore, no peak occurred in March and the value was significantly lower than for diploids (ANOVA 2,  $p < 0.05$ ).

The haemocyte mortality remained at low values ( $3.4\% \pm 1.5\%$ ; N = 119) along the sampling period except for two peaks observed in March ( $9.7\% \pm 2.3\%$ ; N = 10),  $p < 0.05$ ) and in June ( $11.6\% \pm 6.1\%$ ; N = 9,  $p < 0.05$ ) for diploids only (fig. 32B). In triploids, the haemocyte mortality remained low ( $4.2\% \pm 3.0\%$ ; N = 146), the lowest values were observed in January and February ( $2.5\% \pm 1.3\%$ ; N = 20).

#### 3.2. Phagocytosis

In both diploids and triploids, the phagocytic index showed a broad and regular variation over the year (Fig 32C). In September significant highest values were observed ( $61.6 \pm 11.1\%$ , N = 10 for diploids and  $57.3\% \pm 14.4\%$ ; N = 10 for triploids), compare to the lowest values observed in July for diploids ( $31.4\% \pm 11.0\%$ ; N = 27) and in June for triploids ( $34.43\% \pm 8.14\%$ ; N = 9). For this parameter, individual intra-monthly variations remained within the same range throughout the year and between the two cytogenetic statuses.

#### 3.3. Immune parameters and sex

In diploid as well as in triploid individuals THC and haemocytes mortality are not different regarding the sex of oysters sampled from May 2004 to August 2004. However, phagocytic index differences with gender and cytogenetic status were observed. Female triploids' phagocytic index was significantly higher than both male triploids and female and male diploids (table 8).

### 3.4. Immune parameters and maturation stages

Taking into account the maturation stages of each group of cytogenetic status and gender, THC increased ( $7.4 \times 10^5 \pm 8.4 \times 10^5$  cell.ml<sup>-1</sup>; N = 6 to  $9.5 \times 10^5 \pm 7.1 \times 10^5$  cell.ml<sup>-1</sup>; N = 6) for diploid females as sexual maturation went on, when a non significant minimum was reached for stage 3 ( $5.6 \times 10^5 \pm 3.8 \times 10^5$  cell.ml<sup>-1</sup>; N = 3) in males (fig. 33A). Conversely, THC decreased for triploid females ( $1.1 \times 10^6 \pm 5.0 \times 10^5$  cell.ml<sup>-1</sup>; N = 2 to  $3.8 \times 10^5 \pm 2.9 \times 10^5$  cell.ml<sup>-1</sup>; N = 3) and males ( $7.6 \times 10^6 \pm 8.8 \times 10^5$  cell.ml<sup>-1</sup>; N = 4 to  $3.9 \times 10^5 \pm 2.0 \times 10^5$  cell.ml<sup>-1</sup>; N = 4) as sexual maturation advanced. A significant maximum ( $p < 0.05$ ) haemocyte mortality was observed for diploid females ( $12.3\% \pm 5.8\%$ ; N = 7) at maturation stage 2, while the maximum was not significant for the other groups of cytogenetic status and gender (fig 33B). The phagocytic index in diploid females ( $33.9\% \pm 10.9\%$ ; N = 23) and males ( $32.5\% \pm 15.0\%$ ; N = 19) did not change from maturing stages to mature stage (fig 33C). Conversely, for triploid females and males a non significant minimum of phagocytic index was reached at stage 2 ( $34.2\% \pm 8.8\%$ ; N = 4 and  $29.0\% \pm 12.9\%$ ; N = 9 respectively).

## 4. Discussion

The aim of this study was firstly to describe the variation of selected immune parameters of diploids oysters along the year and secondly, to compare immune parameters of triploid and diploid individuals.

### 4.1. External factors

In the present study, the immune parameters varied between the months. Significant peaks were observed for diploids structural immune parameters (THC and haemocytes' mortality) and minima and maxima were observed for the phagocytic index. The number of circulating haemocytes of Bivalves is a very sensitive parameter which can be modulated by mechanical (Ballarin *et al.*, 2003) or chemical disturbance (Auffret et Oubella, 1995, 1997; Auffret *et al.*, 2004; Auffret, 2005). High values are considered as an early sign of disturbance in *Crassostrea gigas* (Auffret et Oubella, 1995), in *Crassostrea virginica* (Goedken et De Guise, 2004) and in mussels (Pipe *et al.*, 1999). As well, high mortality of haemocytes is also a sign of cytotoxicity and media disturbance (Auffret et Oubella, 1997). On the other hand, a high value of the phagocytic index indicates a better efficiency of the immune system

(Galloway et Depledge, 2001) and a decrease of the phagocytic index is usually observed in laboratory studies as a response of haemocytes disturbances due to *in vivo* or *in vitro* exposures to toxic concentrations of xenobiotics (Fournier *et al.*, 2001; Fournier *et al.*, 2002; Gagnaire *et al.*, 2004). Consequently, the present results give evidence of a depressed immune status during early summertime in Pacific oysters. Seasonal variations of structural parameters in Pacific oysters have already been reported in the same area (Auffret et Oubella, 1995). The role of environmental factors such as temperature, in those temperate regions, is suspected: lowest values in wintertime and highest in summertime.

Because the phagocytic index decreases from September, when the seawater is the warmest and the food is largely available, to December when seawater temperature decreases (IFREMER and DDE29 data), the role of temperature is also suspected in these seasonal variations. Under laboratory conditions, the same correlation has been observed between seawater temperature and phagocytic index in *Crassostrea gigas* (Gagnaire *et al.*, 2006a), in *Crassostrea virginica* (Feng et Feng, 1974) in *Mytilus edulis* (Parry et Pipe, 2004) and in *Haliotis diversicolor* (Cheng *et al.*, 2004). Over a maximum of 32°C, the phagocytic index even falls even lower (Cheng *et al.*, 2004) following the temperature driven curve described by van der Meer (2006) for physiological process of molluscs. According to other environmental data (salinity, turbidity, %O<sub>2</sub>, chlorophyll, and various pollutants concentrations) no correlation could have been made with the present variations of the phagocytic index (IFREMER and DDE29). But our results have also shown a very low phagocytic index while seawater was getting warmer. Because the minimum phagocytic index is reached during the spawning period, this discrepancy suggests the implication of other factors in the modulation of phagocytic index, like reproduction, as discuss below.

#### 4.2. Differences between triploids and diploids

Pacific triploid oysters save their glycogen during summer time (Allen et Downing, 1990; Shpigel *et al.*, 1992) for physiological husbandry when diploids use this sugar storage molecule for gametogenesis. Even if gametogenesis has now been reported in triploids Pacific oysters, Sydney rock oysters or blue mussels, it is normally delayed compared to diploids individuals (Allen et Downing, 1990; Shpigel *et al.*, 1992; Cox *et al.*, 1996; Brake *et al.*, 2004). In *C. gigas*, sterility has neither been characterized as gametogenic, nor gametic or zygotic and a higher ratio of hermaphrodite individuals in triploids has been observed (Allen et Downing, 1990). Yet in our study, no difference between diploids and triploids was



observed in terms of gametogenesis (data not shown). The comparison between the relative sensitivity diploids and triploids immune competence following challenges with chemicals or pathogenic agents is still the object of controversial results as recently reviewed (Nell, 2002). But in the present study, the phagocytic index of triploids reproduced the same seasonal pattern as diploids. Moreover, the minimum phagocytic index was observed, as in diploids, during triploids spawning period, suggesting for a strong link between the reproductive physiology of the animal and its immune system. Yet, it is interesting to note that triploids spawned a month earlier (June) than diploids and from this moment, the increase in the phagocytic index preceded the diploids' increase in the phagocytic index by one month until September. The triploids structural immune parameters (THC and haemocytes' mortality), however, did not follow the diploids pattern. The nursery origin of the triploids sampled may explain the reduced heterogeneity within the batch compare to the wild diploids spat. But since no maximum was observed in triploids, in March and June, for THC and haemocytes mortality, and fewer variations had been recorded along the year, one can argue for a reduced sensitivity of these triploids immune parameters to environmental factors. This conclusion also suggests that other factors drive the variations of phagocytic index.

#### 4.3. Internal factors

High values of the structural parameters have been also observed in clams reared in poor quality site during or following spawning periods, regardless the gametogenic stages however (Soudant *et al.*, 2004). In another study, reduced phagocytic index of the pool of haemolymph, during the spawning period was also observed, in blue mussel reared in the Gulf of Saint Lawrence, but after a progressive increase (Cartier *et al.*, 2004). The importance of this stressful period on the bivalve physiology is also highlighted by a maximum of lysosomal stability of a pool of digestive cells found in natural blue mussel beds of the north Adriatic coastal waters (Petrovic *et al.*, 2004). All these former studies did not however take into account either the sex or the gametogenic stages of the sampled individuals. In this study, a decrease of phagocytic index was observed prior to spawning period in 2003 and in 2004, even though diploid and triploid oysters did not spawn in 2004. Therefore, the physiological pathways leading to the spawning process, and not the spawning process itself, may be responsible for these impairments. Changes in haemocyte's subpopulation are another internal factor that may explain the observed pattern. Indeed, it has been demonstrated, in *Crassostrea virginica*, that different haemocytes subpopulations draw different phagocytic index

(Goedken et De Guise, 2004). But in contrast to *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* (Xue *et al.*, 2001), *Mytilus edulis* (Dyrynda *et al.*, 1997) and *Chlamys farreri* (Jing et Wenbin, 2005), the differential assessment of phagocytic activity in haemocytes subpopulations was not performed in this study because, it would have involved the use of antibodies or fluorescent probes that would have interfered, with the phagocytosis process itself. Therefore, we were not able to follow seasonal changes in haemocyte subpopulation.

The relationship between the immune system and reproductive cycles was studied through the support of histological observation. Despite the observation that some immune changes (haemocytes mortality and phagocytic index) appeared to occur at a peculiar maturation stages, such as stage 2, no clear link between these two functions was shown here. But as haemocytes are involved in functions other than immune defence such as nutrition, osmoregulation and endocrine function (Hine, 1999), we cannot exclude that a relationship between reproduction and immune system can exist in bivalves as in vertebrates (Fournier *et al.*, 2000). Recent studies have provided evidences of the effects of 17 $\beta$ -oestradiol (E2), a steroid hormone involved in the reproductive cycle of invertebrates and vertebrates, and E2-like xenobiotics on the morphology and the intracellular [Ca<sup>2+</sup>] of blue mussel haemocytes have been raised (Canesi *et al.*, 2004a; Canesi *et al.*, 2004b). Because Ca<sup>2+</sup> is implicated in both cytoskeleton movements and phagocytosis, E2 may be a key molecule in the seasonal pattern of phagocytic index. However, the role of E2 in the reproductive cycle in bivalves must be clarified as dopamine and serotonin appear to control this cycle (Gagne *et al.*, 2004).

## 5. Conclusion

This study has shown that immune parameters, especially phagocytosis, drawn marked seasonal variations, in relation with reproductive cycle in *Crassostrea gigas*, in diploid and triploid individuals. Triploids were shown to respond less to environmental variations than diploids. Further experiments should now focus on the relationship between reproduction and immune function and on the toxic effects of xenobiotics on triploids.

**Acknowledgements**

The authors would like to thank Sorchá Ní Longphuirt, for English revising, Alain Marhic for its valuable technical help as well as the team of “Huîtrerie du Chateau” for animal delivery throughout the experiment. This study was part of the CONCHPOL project funded by the French "Réseau d'innovation et technologie de la mer" (RITMER).

**References** (*en fin de chapitre*)

Tableau 8 : Mean and standard deviation of the immune parameters regarding sex and cytogenetic status. Data were obtained from individuals sampled from May 2004 to August 2004. Statistical analyses are detailed in the text.

		<i>THC (<math>\times 10^5 \text{ cell.ml}^{-1}</math>)</i>		<i>Haemocytes' mortality</i>		<i>Phagocytic activity</i>	
			<i>n</i>		<i>n</i>		<i>n</i>
<i>Triploid</i>	<i>f</i>	6.9 $\pm$ 4.4	15	4.8 $\pm$ 3.1	21	44.6 $\pm$ 16.6 *	21
	<i>m</i>	5.6 $\pm$ 4.2	18	4.9 $\pm$ 3.2	24	33.5 $\pm$ 10.9	23
<i>Diploid</i>	<i>f</i>	8.5 $\pm$ 6.9	17	6.0 $\pm$ 5.4	24	33.9 $\pm$ 10.9	23
	<i>m</i>	10.0 $\pm$ 8.9	14	6.2 $\pm$ 4.2	19	32.5 $\pm$ 15.0	19

(\*) indicates significant differences ( $p < 0.05$ )

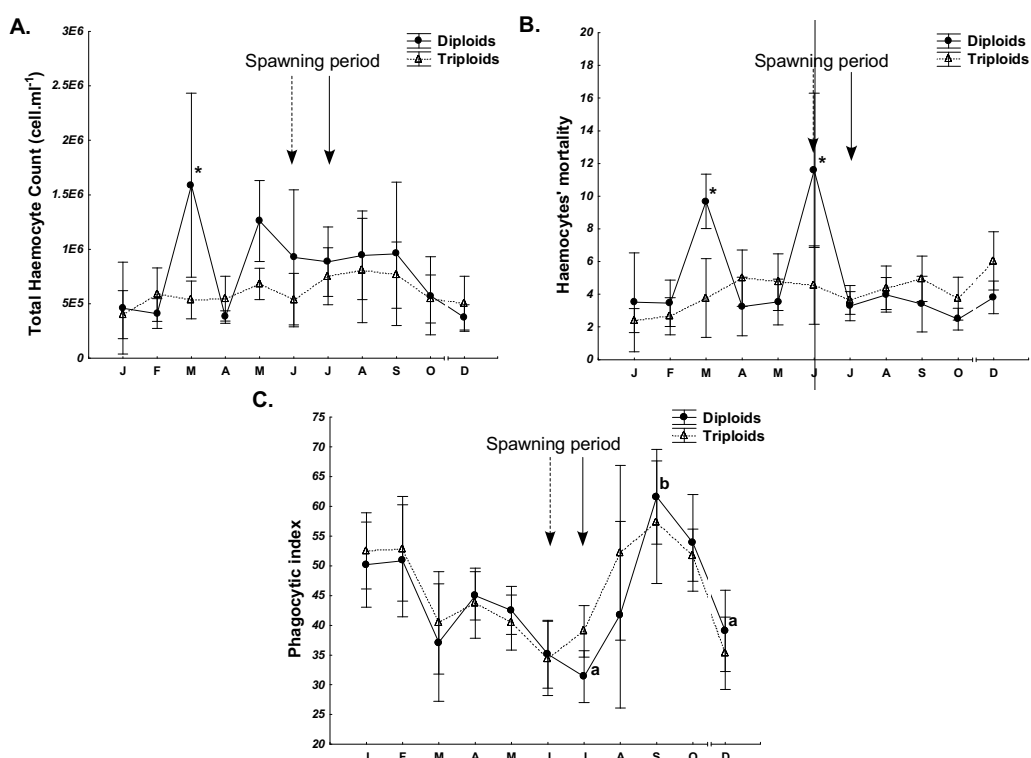


Figure 4.1 : Immune parameters variations (A, THC; B, haemocyte mortality; C, phagocytic index) analysed during 15 months from May 2003 to August 2004 of diploid and triploid Pacific oysters. May and July are duplicated and no data have been sampled in November 2003. Arrows indicate the time of spawning in 2003. Points represent the mean value of the parameter for all the individuals of a month. Vertical bars represent the standard deviation. Stars (\*) or letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Statistical analyses are detailed in the text.

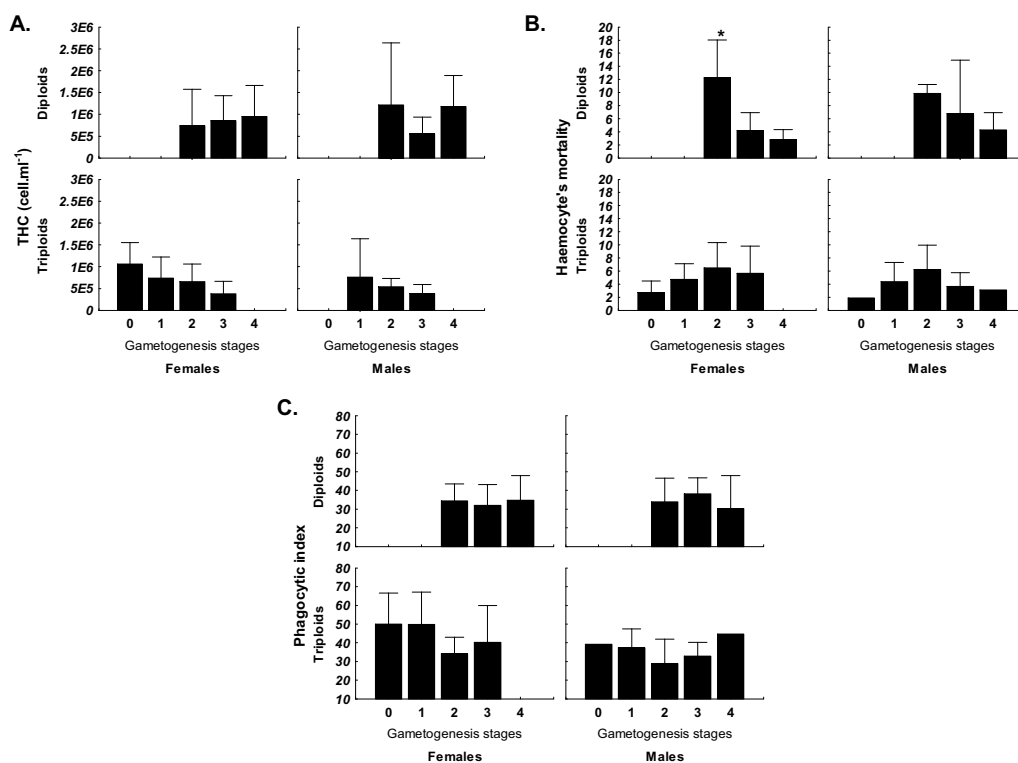


Figure 4.2: Immune parameters variations (A, THC; B, haemocyte mortality; C, phagocytic index) regarding cytogenetic status, sex and gametogenic stages. Data were obtained from individuals sampled from May 2004 to August 2004. Bars represent the mean value for a maturation stage. Vertical bars represent the standard deviation. Stars (\*) indicates significant differences ( $p < 0.05$ ). Statistical analyses are detailed in the text.

**III. Impact de la reproduction et des paramètres environnementaux sur les variations saisonnières des paramètres immunitaires chez la moule, *Mytilus edulis***

## Seasonal changes of immune parameters in the blue mussel, *Mytilus edulis*, related to sex, gametogenesis and environmental factors

Article en préparation

Matthieu B. Duchemin<sup>1,2,✉</sup>, Nelly Legoic<sup>1</sup>, Michel Fournier<sup>2,3</sup>, Michel Auffret<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des sciences de l'environnement marin, UMR CNRS 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, place Nicolas Copernic, 29 280 Plouzane – France

<sup>2</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, 245 Hymus, Pointe-Claire, H9R 1G6, Quebec – Canada

<sup>3</sup>Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 310 Allée des Ursulines, Rimouski, G5L 3A1, Quebec – Canada

✉tel.: +33(0)298498677 fax: +33(0)298498645 email: [matthieu.duchemin@univ-brest.fr](mailto:matthieu.duchemin@univ-brest.fr)

### 1. Introduction

Bivalves present an innate immune system and cellular mediation relies on haemocytes, the only cell population in the haemolymph, the circulating fluid (Cheng, 1981; Fisher, 1986, 1988). Though bivalves have semi-open circulatory system, haemocytes face physical and chemical changes in the encountered water column. A number of environmental factors such as temperature (Feng et Feng, 1974; Fisher, 1988; Hégaret *et al.*, 2003a, 2003b; Gagnaire *et al.*, 2006a), salinity (Auffret et Oubella, 1995; Gagnaire *et al.*, 2006a) or algal diets (Delaporte *et al.*, 2003; Hégaret *et al.*, 2004; Delaporte *et al.*, 2005) induce variations in the immune system. But all these factors have been investigated as shocks whereas seasonal changes occur continuously and as a combination of all these factors. Thereby, it is the stressful effect of the shock, and not the factor itself, that has been investigated in the former studies.

Elsewhere, the reproductive cycle of bivalves, especially spawning, was supposed for a long time to be related to seasonal changes of immune endpoints such as lysosomal stability (Petrovic *et al.*, 2004; Cho et Jeong, 2005) or phagocytosis (Cartier *et al.*, 2004; Soudant *et al.*, 2004; Lemaire *et al.*). But the recent comparison of two batches of *Crassostrea gigas* differing from their reproductive efficiency (triploids and diploids) as the adjunction of sex and gametogenesis assessment has demonstrated that immune parameters were varying with sex and stages of gametes development.



As filter feeder, sedentary and ubiquitous animals in estuarine and marine ecosystems, the blue mussel, *Mytilus edulis*, is a model species that have been largely utilized in marine and estuarine researches. Its immune system has therefore been investigated in ecophysiological studies (Barcia *et al.*, 1999; Mitta *et al.*, 2000; Canesi *et al.*, 2002; Wooton *et al.*, 2003; Canesi *et al.*, 2004a; Cartier *et al.*, 2004; Canesi *et al.*, 2006; Lemaire *et al.*, 2006), in ecotoxicological studies (Pipe *et al.*, 1999; Canesi *et al.*, 2004b; Parry et Pipe, 2004; Gagne *et al.*, 2006b) and in monitoring programmes (Pipe *et al.*, 1995b; Cajaraville *et al.*, 1996a; Luengen *et al.*, 2004; Aarab *et al.*, 2006; Auffret *et al.*, 2006). But any of the former studies have considered sex and gametogenesis as confounding factors of the observed immune changes. Thus it is interesting to utilize this other model species of bivalves in the current study. Moreover, conversely to the Pacific oyster, this bivalve happens to spawn twice a year in many geographical zones mainly related to seawater temperature (Gosling, 2003; MPO, 2003; Figueras, 2006).

To investigate further the hypothesis of the relationship between the immune system and the reproduction in bivalves, for two years the immune system, the sex, and the gametogenesis have been monitored in the blue mussel. Moreover, in order to understand the impact of seasonal changes of environmental factors of the water column on the immune system, temperature, salinity, chlorophyll concentration, O<sub>2</sub>, and turbidity have been monitored with a MAREL buoy throughout the survey.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Mussels*

From March 2005 to May 2006, each month 20 mussels (45 mm – 55 mm) were collected on the natural rocky bed of the Pointe du Diable (Britanny, France), one hour after low tide and put in filtered seawater 12 h before processing.

### *2.2. Water column monitoring*

Seawater temperature, salinity, dissolved oxygen, and chlorophyll a concentration were monitored at high frequency with the MAREL Iroise data buoy (Blain *et al.*, 2004). This device was located at 100 m of the site of the Pointe du Diable.

### *2.3. Hemolymph withdrawal*

For each individual sampled, hemolymph was withdrawn from the anterior adductor

muscle sinus, with a 2 mL syringe and a 21G needle. A millilitre was collected from each individual and transferred into 1.5 mL plastic tubes and stored on ice before analysis. All analysis was performed individually as follows:

#### 2.4. Haemocyte mortality

Propidium iodide (PI) is membrane impermeable and therefore is excluded from viable cells and fluoresces in the red when bound to DNA. In a 5 mL Falcon® tube, 50 µL of hemolymph (collected from treated individuals or from treated pools) to be analysed was poured into 250 µL of anti-aggregating solution (HAAS pH = 6.7; Osmolarity = 920 mOsm.kg<sup>-1</sup>) according to Auffret and Oubella (1994). PI was added to a final concentration of 10 µg.mL<sup>-1</sup> and tubes incubated 10 min at 4 °C in the dark before flow cytometry analysis was undertaken within the hour (Brousseau *et al.*, 1998). The fluorescence level was measured on FL3 photodetector and further analyzed with CellQuest® (Becton-Dickinson) software. The percentage of haemocytes that had incorporated PI was used to measure haemocyte mortality.

#### 2.5. Total haemocyte counts (THC)

THC was assessed by flow cytometry (Facsan® Becton Dickinson) from the former hemocyte preparations. The flow cytometer was operated with PBS (400 mOsm.kg<sup>-1</sup>) as sheath fluid. The flow rate was measured to allow absolute cell counts and the cells were counted arbitrarily for 52s.

#### 2.6. Phagocytic index and Haemocyte Phagocytic Capacity

The phagocytosis assay was performed *ex vivo* as described by Auffret *et al.* (2004), a protocol slightly modified from Brousseau *et al.* (1998). In summary, a hundred microlitre of each individual hemolymph was deposited into the well of a 96-well microplate. Haemocytes were put then into contact with a solution of 2 µm fluorescent latex beads (Polysciences®, GmbH) according to a bead:haemocyte ratio of 30:1. After gentle centrifugation (4 °C, 300 g, 10 min.), the microplate was incubated for 4 h at 15 °C in the dark. To detach the cells from the well walls, HAAS complemented with trypsin (0.5 g.L<sup>-1</sup>) was finally added and the microplate was agitated for 5 min. The content of each well was then transferred into cytometry tubes before flow cytometry analysis (Facsan®, Becton-Dickinson). Based on fluorescence two phagocytic parameters were calculated from CellQuestPro ® (Becton-

Dickinson) software. The phagocytic index was the relative number of haemocytes that has engulfed at least 3 beads. The haemocyte phagocytic capacity (HPC) was calculated as the mean number of engulfed beads within the phagocytic haemocytes population (Lehmann *et al.*, 2000).

#### *2.6. Sex and sexual maturation determination*

Gonadal tissue was sampled in the mantle of the dorsal (right) valve and put in Bouin's fixative solution for 48h. Gonad samples were then dehydrated and embedded in paraffin® through an automatic carousel. Sections of 5 µm were cut from the samples and put on slides. Haematoxylin-eosin coloration was used to observe germinal structures. Sex and sexual maturation were defined according to the commonly used five-stage classification (Lubet, 1959; Gosling, 2003) as follows: (0), resting period; (1), initiation of gametogenesis; (2), gonadal maturation stage; (3), final maturation stage; (4), spawning stage.

#### *2.7. Statistical analyses*

For the immune parameters, normality of the phagocytic index was test with the Kolmogorov-Smirnoff test. THC, hemocyte mortality and HPC were Log-transformed to fit a normal distribution. An ANOVA 2 was performed to test the month and the sex as explaining differences among values, followed by a HSD Tuckey test *post hoc*. Significant value was set at  $p = 0.05$ . The statistical analyses regarding seawater changing and immune parameters variations are in standby, waiting for the end of data collection.

### **3. Results**

#### *3.1. Monitoring of the reproductive cycle*

The monitoring of the gonads revealed last stages of gametogenesis in March and April 2005 and first figures of spawning in May 2005. Resilient mature gametes remained in gonads from June to October 2005 when first stages of gametogenesis appeared. The second year, first spawning occurred earlier, in March 2006 while late stages of gametogenesis were observed the other months (Fig 4.3& 4.4).

#### *3.2. Immune endpoints seasonal variations and sex*

The immune parameters showed marked seasonal variations for males and females. Without regarding sex, from  $5.35 \times 10^5 \pm 4.58 \times 10^5$  cells.mL<sup>-1</sup> (N = 20), in March 2005, THC

increased continuously until reaching  $12.1 \times 10^5 \pm 6.99 \times 10^5$  cells.mL<sup>-1</sup> (N = 16), in June 2005. The following three months, THC remained constant at  $8.20 \times 10^5 \pm 3.54 \times 10^5$  cells.mL<sup>-1</sup> (N = 60). A slight decrease occurred in October 2005 ( $6.42 \times 10^5 \pm 2.82 \times 10^5$  cells.mL<sup>-1</sup>; N = 20) after increasing in November and decreasing back until reaching a plateau ( $3.6 \times 10^5 \pm 6.77 \times 10^5$  cells.mL<sup>-1</sup>; N = 78) from February to May 2006 (Fig 4.5A). Haemocyte mortality changing appeared to be more erratic and varied between  $3.62\% \pm 1.16$  (N = 20), in July 2005, and  $9.93\% \pm 3.67$  (N = 15), in March 2005 (Fig 4.5B). The phagocytic index drawn a more regular pattern with three maxima in March 2005 ( $59.2\% \pm 15.3$ ; N = 15), in September 2005 ( $51.5\% \pm 14.8$ ; N = 20), and in February 2006 ( $60.4\% \pm 14.8$ ; N = 20), followed by three minima in May 2005 ( $40.4\% \pm 11.0$ ; N = 20), in October 2005 ( $36.2\% \pm 8.94$ ; N = 19), and in March 2006 ( $45.1\% \pm 14.4$ ; N = 20), after immediate increase (Fig 4.5C). These extreme values were significant ( $p < 0.05$ ). HPC started to decrease from February 2005 ( $14.8 \pm 7.9$  beads; N = 15) until reaching a plateau ( $9.74 \pm 0.26$  beads; N = 135) from April 2005 to November 2005, except the occurrence of a peak in September 2005 ( $13.1 \pm 8.52$  beads; N = 20). HPC then increased significantly until February 2006 ( $17.6 \pm 8.49$ ; N = 20) and started to decrease again (Fig 4.5D). For each month the immune endpoints did not significantly differ from males to females ( $p > 0.05$ ) but regarding only the factor sex, males and females significantly differed ( $p < 0.05$ ) for every parameters (table 9).

### 3.3. Water column parameters seasonal variations

Seawater temperature varied from the lowest value at the beginning of February 2005 (8.2 °C) to the highest at the beginning of July (17.8 °C). Seawater temperature remained slightly unchanged until October 2005 when the decreasing occurred (Fig 4.6C). Salinity varied a lot during autumn and wintertime and the first months of spring 2005 and varied less during summer. During winter 2006, salinity was lower than in 2005 (Fig 4.6D). Little was depicted by Chla monitoring, until now, except for the algal bloom observed in mid-May 2005 (Fig 4.6B). O<sub>2</sub> variations showed usual chaotic decrease in spring and summer followed by a smoother increase in autumn and winter (Fig 4.6A).

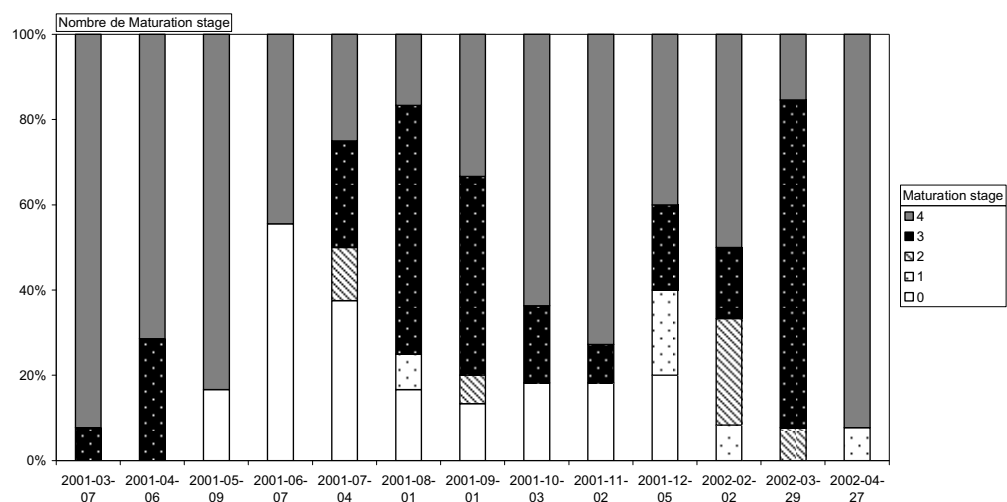


Figure 4.3: Histogramme empilé des fréquences des stades de maturation des femelles, entre mars 2005 et mai 2006, chez *Mytilus edulis*, à la Pointe du Diable (France).

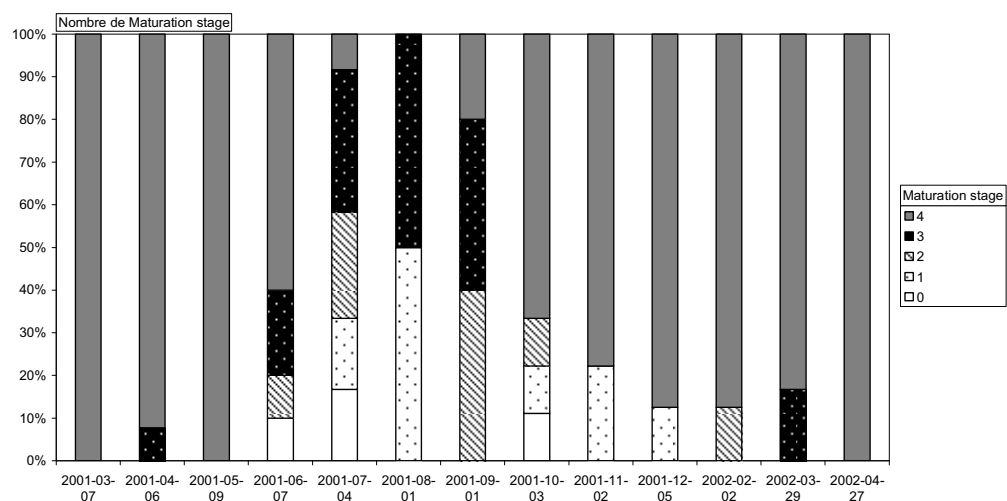


Figure 4.4: Histogramme empilé des fréquences des stades de maturation des mâles, entre mars 2005 et mai 2006, chez *Mytilus edulis*, à la Pointe du Diable (France).

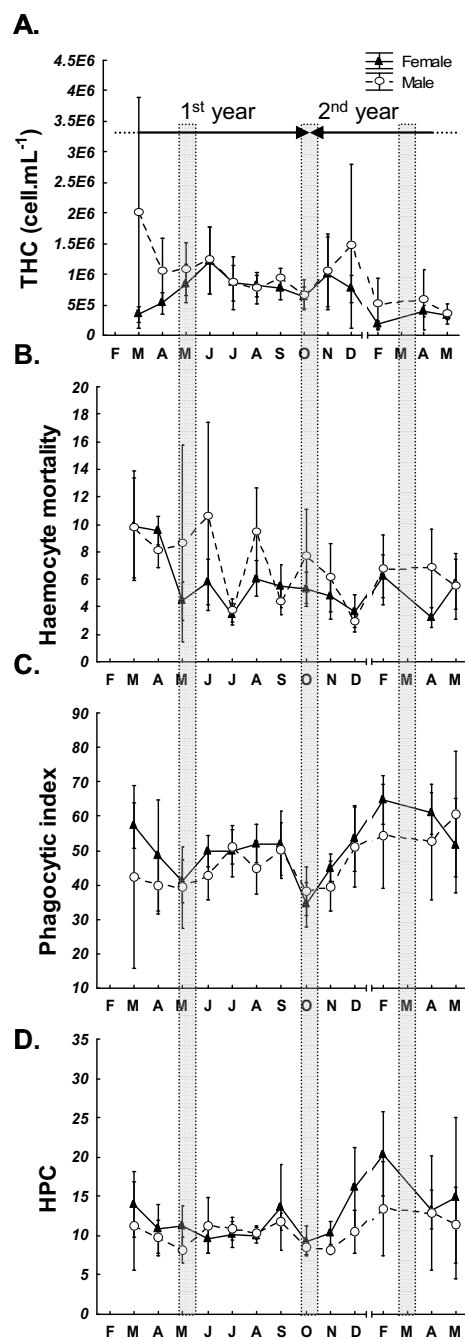


Figure 4.5: Seasonal variations of immune parameters in *Mytilus edulis* from February 2005 to May 2006. A. THC; B. haemocyte mortality; C. phagocytic index; D. HPC. Grey bars: spawning period.

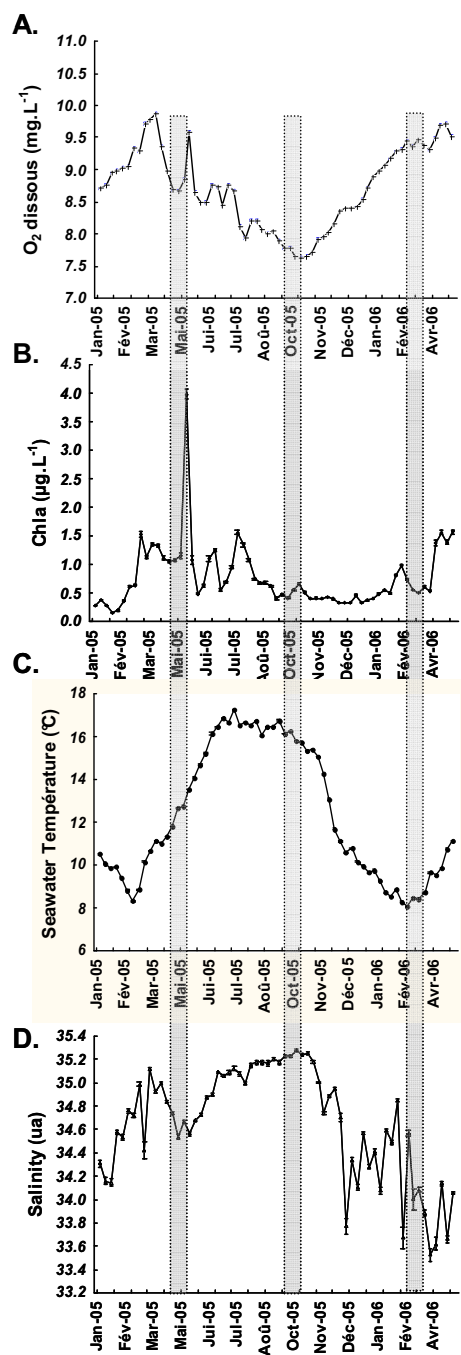


Figure 4.6: Seasonal variations of seawater parameters from February 2005 to May 2006 with MAREL-Iroise data buoy. A. O<sub>2</sub>; B. Chla; C. temperature; D. Salinity. Grey bars: spawning period.

Table 9 : Immune endpoints values of *Mytilus edulis* females and males measured along a 16-month survey. Star (\*) indicates a significant difference from analysis of variance or Mann-Whitney test at  $p = 0.05$ .

		<i>THC</i>	<i>Haemocyte mortality</i>	<i>Phagocytic index</i>	<i>HPC</i>
	<i>N</i>	<i>mean ± sd</i>	<i>mean ± sd</i>	<i>mean ± sd</i>	<i>mean ± sd</i>
<b>Females</b>	144	$6.44 \times 10^5 \pm 4.69 \times 10^5$	$5.6\% \pm 3.36$	$51.3 \pm 14.5$	$12.9 \pm 7.77$
<b>Males</b>	108	$10.5 \times 10^5 \pm 12.4 \times 10^5 *$	$7.08\% \pm 4.76 *$	$45.8 \pm 14.5 *$	$10.5 \pm 3.97 *$

## 4. Discussion

### 4.1. Seasonal patterns

Monthly variations of immune endpoints have already been observed in *Crassostrea gigas* (Auffret et Oubella, 1994; Gagnaire *et al.*, 2006b) as well as in *Mytilus edulis* (Cartier *et al.*, 2004; Petrovic *et al.*, 2004; Lemaire *et al.*, 2006). Monitoring over one year the hemogram of *Mytilus galloprovincialis*, Carballal *et al.* (Carballal *et al.*, 1998) have shown that THC as well as subpopulation haemocyte patterns drew variations. In *Mytilus edulis* and in *Crassostrea gigas*, it has been demonstrated that granulocytes drew higher phagocytic activity than hyalinocytes, the two main haemocytes' subpopulations (Pipe *et al.*, 1997; Goedken et De Guise, 2004). Unfortunately, we did not have the opportunity to use specific antibodies to discriminate subpopulations of haemocytes in mussels as used by Noel *et al.* (Noel *et al.*, 1994) and Dyrinda *et al.* (Dyrinda *et al.*, 1997). Nevertheless, these variations were correlated to seawater temperature and to the occurrence of the *Marteilia refringens* protozoa. Here, we have observed over a 16-month survey also marked variations of all the assessed immune endpoints assuming seasonal patterns of the immune system. We wanted to investigate whether these changes were correlated to changes in the seawater column but the data recorded did not give evidence of such a correlation. Conversely to these results, all the measured seawater column parameters have been shown to induce immune variations (see review by (Oliver et Fisher, 1999). But all these factors have been tested as submitting various values of them to individuals or haemocytes from non-changing physiological conditions. In our study, because season cycles are a combination of endogenous and exogenous variations, the effect of these environmental parameters was tested with physiologically changing individuals.

### 4.2. Impact of gametogenesis on immune endpoints

Because lysosomal stability and phagocytic index were drawing significant differences before and after spawning in *Mytilus edulis* (Petrovic *et al.*, 2004), *Crassostrea gigas* (Cho et Jeong, 2005), and in *Ruditapes philipinarum* (Soudant *et al.*, 2004), spawning and reproductive cycle could be a strong explicative factor of these variations in these animal allowing more than 60% of their energy to reproduction (Pouvreau *et al.*, 2006; van der Meer, 2006; van der Veer *et al.*, 2006). Monitoring immune endpoints and spawning in diploids and triploids oysters, *Crassostrea gigas* (Gagnaire *et al.*, 2006b; Duchemin *et al.*, 2007), minimum of phagocytic index was always observed during spawning period of oysters for



both ploidy batches. Moreover, triploids' minimum of phagocytic index occurred one month earlier than diploids according to gonadal evidence of spawning, even when no gamete emission occurred (Duchemin *et al.*, 2007). The importance of studying the seasonal patterns of immune system in mussels was then to add some evidence to the role of the reproductive cycle in these changing with a species spawning twice a year (Lubet, 1959; Gosling, 2003; MPO, 2003). Our data clearly showed the strict concomitance between spawning period and minimum of phagocytic activity in mussels. But THC data showed also a maximum in mussels one month after each spawning period. According to Carballal *et al.* (Carballal *et al.*, 1998), THC was not correlated to the accumulation of haemocytes in reabsorbing gonads. We are now confident to assume a relationship between the immune system and the reproductive cycle in bivalves. Consequently, these seasonal patterns give evidence of difference of mussels' capacity to fight against pathogenic agents occurring in the water column along the seasons. Second dramatic consequence of our findings is that one must take into account these patterns if one uses immune endpoint to assess ecosystem quality or one may misinterpret its results up to 100%.

In *Crassostrea gigas*, it has been recently observed that the phagocytic index was the lowest when gonads were in the vitellogenic phase (Duchemin *et al.*, 2007). This could have been done because of the use of low-hemolymph consuming methods. But in that study the number of samples to face gametogenic stages and immune response was too low to give significant differences. In the current study, the gametogenic stage was discriminated for every mussel sampled for immune endpoints assessment. On a global point of view, gametogenesis followed variations of phagocytic index and THC. Facing gametogenic stages and immune endpoints parameters for each individual, we believed we could better understand these variations. But the first point getting was that minimum of phagocytic index happened when figures of spawning were observed in only a few individuals. Because haemocytes could also be involved in nutrient transport (Fisher, 1986, 1988; Hine, 1999; Ottaviani, 2004, 2006), one could also assume that THC maximum just after spawning could be related to nutrition of new gonadal tissue. In both cases, individuals in early gametogenesis were not drawing the lowest values of phagocytic index and the highest values of THC of the batch. Secondly, mature stages of gonads appeared at nearly all sampled months with a majority of these stages just before spawning, while the very first stages appeared only at, or just after the spawning period. These histological data give evidence that the immune

variations could be linked with some other invisible changing in gonads. Phagocytosis of mussels' haemocytes is altered by 2.5µM of *in vitro* exposure to E2 due to intracellular changes of  $[Ca^{2+}]$  in response to MAP-kinase activation through membrane and nuclear E2 receptors (Canesi *et al.*, 2004a). Exposure of *Mya arenaria* and *Mytilus edulis* to E2, and other estrogens, also induce significant immune changes (Canesi *et al.*, 2006; Gauthier-Clerc *et al.*, 2006b) and is naturally synthesized along the year in these species (Zhu *et al.*, 2003; Gauthier-Clerc *et al.*, 2006a). Therefore oestrogen hormones could be a good candidate of a messenger between gonadal development and immune competency. But plasma levels have not been assessed in exposure experiments nor in seasonal studies and to our extent, the role of oestrogen in the reproductive cycle of bivalve remains poorly understood.

#### 4.3. Impact of sex on immune endpoints

While drawing similar seasonal patterns, there are significant differences for all measured parameters regarding sex. Males and females draw different immunocompetency in many vertebrate species, as mice, marine mammals, and Fish. In the current study, the two parameters assessing the phagocytic activity of individuals, the phagocytic index and the haemocyte phagocytic capacity, are higher for females. Recent data in *Crassostrea gigas*, a protandrous hermaphrodite species, showed that 2-year females draw higher phagocytic index than same age males (Duchemin *et al.*, 2007). Our data suggest therefore a difference between males and females to fight against foreign agents and to environmental biological challenges. These two results on bivalves tend to demonstrate the strong relationship between immunocompetency and sex physiological changes and again, make us assume of a role of estrogens which levels in bivalves' gonadal tissues differ regarding sex (Siah *et al.*, 2003; Gauthier-Clerc *et al.*, 2006a). This factor also jams the immunotoxic signal up to 20% and must, from now, be taken into account in further studies assessing the immune system.

## 5. Conclusion

From this extensive ecophysiological study in *Mytilus edulis* regarding the endogenous or oceanographic footprints on the seasonal variations of the immune function, it was shown that these factors had to be taken into account when assessing the immune system for health or risk assessment purposes. Seasonal changing were marked and the reproductive cycle as gametogenesis weighed more than environmental parameters in these changing. On the other hand the mechanism of the impact of the spawning period, a crucial time point correlated to

these changing, remains unclear. Sex played another major impact on the immune system throughout the year. Finally, further studies should involve hormonal axis in the hemolymph.

#### **IV. Valeurs synthétiques des paramètres immunitaires chez les bivalves**

En considérant l'ensemble des observations obtenues lors des suivis mensuels effectués chez *Crassostrea gigas* à Belon (Bretagne, France), entre mai 2003 et août 2004 et sur *Mytilus edulis*, en rade de Brest, à la Pointe du Diable (Bretagne, France), entre février 2005 et mai 2006, on peut définir des valeurs moyennes, mois et sexes confondus, pour les paramètres immunitaires (Tableau 10). À ces valeurs, les observations hebdomadaires des paramètres immunitaires des moules, prélevées à Métis (Québec, Canada), au mois d'octobre 2004 et juin 2005, peuvent être ajoutées, à la précision près que les conditions de transport et de conditionnement avant analyse ne sont pas les mêmes (Cf. partie suivante). Cette organisation des données permet de considérer que la majorité (50%) des valeurs des paramètres immunitaires de la population considérée est comprise entre ces quartiles. Ce tableau synthétique peut alors servir lors de comparaisons interpopulationnelles ou interspécifiques.

Tableau 10 : Moyennes et valeurs des paramètres immunitaires (THC, mortalité hémocytaire, indice phagocytaire et HPC) chez 50% d'une population d'huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) élevées à Belon, entre mai 2003 et août 2004, d'une population sauvage de moules bleues (*Mytilus edulis*) de la Pointe du Diable (Rade de Brest, France), entre février 2005 et mai 2006, et enfin d'une autre population sauvage de moules bleues, à Métis (Québec), échantillonnées hebdomadairement au mois d'octobre 2004 et au mois de juin 2005. Pour ce dernier site, les paramètres immunitaires ont été mesurés après 6 jours en bassin, nourries quotidiennement par *T iso* et 24 h de confinement en tube, le 7<sup>ème</sup> jour.

	<i>Crassostrea gigas</i>				<i>Mytilus edulis</i>							
					<i>Rade de Brest</i>				<i>Métis</i>			
	<i>n</i>	25%	$\bar{x}$	75%	<i>n</i>	25%	$\bar{x}$	75%	<i>n</i>	25%	$\bar{x}$	75%
<b>Total Haemocyte Counts (<math>\times 10^5</math> cells.mL<sup>-1</sup>)</b>	259	3.72	7.56	9.92	280	3.55	6.84	8.94	115	3.63	9.04	10.3
<b>Haemocyte mortality</b>	264	2.2	4.5	6.1	280	3.6	6.2	8.2	117	3.4	7.6	9.0
<b>Phagocytic index</b>	287	35.2	43.2	52.4	280	40.0	49.6	59.6	117	54.5	62.1	73
<b>Haemocyte Phagocytic Capacity</b>	nd	nd	nd	nd	280	8.3	11.6	12.9	117	15.5	21.8	27

## V. Synthèse

Ce chapitre s'est intéressé à l'étude des facteurs d'impact, autres que chimiques, sur la modulation des paramètres immunitaires chez les bivalves.

Ce chapitre a démontré la réalité de l'importance de ces variations sur le système immunitaire, notamment de la phagocytose, chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et chez la moule, *Mytilus edulis*. La phagocytose des hémocytes de ces deux espèces de bivalves peut varier du simple au double au cours des mois.

L'approche expérimentale suivant, par histologie, le stade de maturation des huîtres diploïdes et triploïdes, pondant une fois l'an et des moules pondant deux fois dans une année, a permis de montrer le rôle prépondérant de la période de ponte en terme d'immunocompétence. La discrimination des paramètres immunitaires selon le sexe a également mis en évidence que les femelles étaient plus immunocompétentes que les mâles. Enfin, les paramètres environnementaux de la colonne d'eau n'ont que peu d'influence sur les variations des paramètres immunitaires, au regard de la gamétogenèse.

Le chapitre suivant étudiera l'impact de ces facteurs saisonniers sur les effets immunotoxiques de polluants présents dans le milieu marin, à l'aide des développements méthodologiques du chapitre 3.



# *Chapitre 5. Impact des xénobiotiques*

---

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>201</b>
<b>II. IMPACTS IMMUNOTOXIQUES DES ACTIVITES ANTHROPIQUES EN MILIEU MARIN</b>	<b>202</b>
<b>III. SYNTHESE</b>	<b>223</b>





## 1. Introduction

L'utilisateur d'outils immunotoxicologiques doit prendre en compte le sexe et la période de l'année de son étude en fonction du cycle reproducteur de espèces sentinelles utilisées. Avec le protocole d'exposition individuelle « *in tubo* », le contrôle accru des conditions expérimentales permet de mettre en place des séries d'expositions sub-aigues de contaminants chimiques sur des périodes de temps relativement courtes. Ainsi les résultats précédents des expérimentations d'écophysiologie et de développement méthodologique seront mis à profit dans l'étude écotoxicologique suivante. De nombreuses activités anthropiques génèrent sur l'environnement marin côtier différents impacts chimiques (OSPAR, 2000) pouvant se révéler immunotoxiques chez les Invertébrés (Galloway et Depledge, 2001), notamment chez les Bivalves (Auffret, 2005). Dans l'étude suivante, l'impact chimique de certaines activités anthropiques (le transport maritime, l'agriculture intensive sur les bassins versants et l'urbanisation ou le tourisme) sur le système immunitaire des bivalves est modélisé, en étudiant des molécules caractérisant ces activités (le tributylétain, le diuron®, l'atrazine et le 17 $\beta$ -oestradiol). Mais l'intensité des impacts chimiques varie en fonction de l'intensité et du rythme des activités correspondantes. Ainsi, selon le site géographique ou les saisons, les concentrations des polluants dans la colonne d'eau changent. C'est pourquoi dans l'étude suivante, les effets immunotoxiques des quatre molécules sont analysés d'abord seuls, à plusieurs concentrations pertinentes du point de vue environnemental, à deux périodes de l'année, critiques pour la reproduction. Ensuite, pour une saison donnée, les effets immunotoxiques de mélanges modélisant différents bassins d'activités seront présentés. A chaque fois, les résultats seront discutés en fonction du sexe des individus testés.

## ***II. Impacts immunotoxiques des activités anthropiques en milieu marin***

## Assessment of immunotoxic impacts of estuarine anthropogenic activities in *Mytilus edulis* through individual “in tubo” exposure

Article en préparation

Matthieu B. Duchemin<sup>1, 2, ☒</sup>, Sophie Gauthier-Clerc<sup>2</sup>, Michel Auffret<sup>1</sup>, Michel Fournier<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des sciences de l'environnement marin, UMR CNRS 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, place Nicolas Copernic, 29 280 Plouzane – France

<sup>2</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, 245 Hymus, Pointe-Claire, H9R 1G6, Quebec – Canada

<sup>3</sup>Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 310 Allée des Ursulines, Rimouski, G5L 3A1, Quebec – Canada

☒ tel.: +33(0)298498677 fax: +33(0)298498645 email: [matthieu.duchemin@univ-brest.fr](mailto:matthieu.duchemin@univ-brest.fr)

### 1. Introduction

Immunotoxic effects are defined as an effect (adverse or not) on one, or several, component of the immune system (Galloway et Depledge, 2001). The more immunotoxic studies have been published, the more we have learnt about the toxic effects of chemicals on animal immune system, even for those that have not been designed to provoke such effects (Woolhiser *et al.*, 2005). The occurrence of these pollutants in the environment have led to investigate their potency on the immune system of many model species such as marine mammals (De Guise, 2005), reptiles (Rooney, 2005), amphibians (Rollins-Smith et Smits, 2005) and invertebrates such as earthworms (Goven *et al.*, 2005), and bivalves (Auffret, 2005) using a tier of immune endpoints (Luster *et al.*, 1992; Luster *et al.*, 1993; Germolec, 2004).

Estuarine ecosystems are classically defined as a buffer zone between freshwater and ocean. But these ecosystems are often also a site of human effervescence such as ports, marinas, aquaculture farms and fisheries, etc. For our present purpose they will be considered as equivalent to marine coastal ecosystems. Therefore, these peculiar ecosystems are at first line of chemical impacts of maritime human activities but also from upward industrial or agricultural wastes (table 1). Different estuarine sites exist depending on the importance of the activity basin and may be characterised by three human activities: human population, maritime transport, and. agricultural activities. Each of these activities may chemically impact the aquatic environment and is assessed in the current study by one chemical.

The use of pharmaceuticals and personal care products (PPCP) is related to human habits.

Most of these chemicals appear in the estuarine ecosystems because they are not treated in municipal water treatment plants (Ellis, 2006). Therefore PPCPs characterised the chemical impact of human population. Presently, 85 % of the cities of the Mediterranean border do not treat their urban sewages (UNEP, 2006). Among this diversity of chemicals 17 $\beta$ -oestradiol (E2) is classically studied and monitored in aquatic ecosystems (Gagne *et al.*, 2004; Gagne *et al.*, 2006b). This steroidal hormone is naturally synthesised by animals such as mussels (Zhu *et al.*, 2003) and its concentration varies with the reproductive cycle of clams (Gauthier-Clerc *et al.*, 2006a). Although it is an endocrine disrupter, chronic exposure of clams also induces immunotoxic responses at 10<sup>-9</sup>M (Gauthier-Clerc *et al.*, 2006b) while acute exposure of mussels haemocytes induces morphological and intracellular Ca<sup>2+</sup> changes at 10<sup>-8</sup>M (Canesi *et al.*, 2004a). Finally, xenoestrogens may be a thousand times more potent than E2 (Canesi *et al.*, 2004b).

Tributyltin (TBT) is a persistent biocide used in antifouling paints of hulls. It bioaccumulates through the food web or gets sequestered in sediments and reloaded during dredging works or storm mediated events (Eggleton et Thomas, 2004). It induces several endocrine disorders such as delaying gametogenesis in clams (Siah *et al.*, 2003) but also impairs phagocytosis in several bivalves (Auffret et Oubella, 1997; Bouchard *et al.*, 1999; Gagne *et al.*, 2006c) and other toxic effects (Hagger *et al.*, 2005) and regardless regulations, it is still measured in many marine ecosystem around the world (Fent, 1996).

Atrazine is a triazine pesticide used on corn crops. Maximal concentrations found in European surface waters are 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$  and 80  $\mu\text{g.L}^{-1}$  in North American's (Russo et Lagadic, 2004). Atrazine impairs the peroxidase activities of haemocytes in *Crassostrea gigas* (Gagnaire *et al.*, 2003) and total haemocyte counts in *Lymnaea stagnalis* challenged with *in vivo* chronic exposure at environmental doses (Russo et Lagadic, 2004). This pesticide also regulates the expression of family genes in *Platichthys flesus* (Marchand *et al.*, 2006) and in *Crassostrea gigas* (Tanguy *et al.*, 2005).

Diuron® is a urea derivate pesticide used on crops and in new antifouling paints. In British ports or marinas its concentration may be 7  $\mu\text{g.L}^{-1}$  while it is 0.7  $\mu\text{g.L}^{-1}$  in estuaries (Chesworth *et al.*, 2004). As for atrazine, it induces differential gene expression in *Platichthys flesus* (Marchand *et al.*, 2006) and in *Crassostrea gigas* (Tanguy *et al.*, 2005), but it also severely impairs the B-lymphocytes in acute *in vitro* exposure (Couderc *et al.*, 1983).

As filter feeder, sedentary and ubiquitous animals in estuarine and marine ecosystems, mussels have been largely utilized in ecotoxicological studies and monitoring programmes. In Quebec, the blue mussel, *Mytilus edulis*, has been introduced in 1982 and actual annual production is 9 000 t (FIGIS, 2006). The blue mussel usually spawns twice a year but in the Eastern coast of

Canada, it spawns in July and sometimes in September depending on the water temperature (MPO, 2003). Haemocytes are the bivalves' defence cells circulating in the haemolymph in a semi-open circulatory system. Many xenobiotics draw toxic effects on the immune system invertebrates such as pesticides (Voccia *et al.*, 1999; Galloway et Handy, 2003), heavy metals (Pipe *et al.*, 1995b; Fournier *et al.*, 1998; Pipe *et al.*, 1999; Brousseau *et al.*, 2000; Fournier *et al.*, 2001; Fournier *et al.*, 2002; Gagnaire *et al.*, 2004) and other xenobiotics (Selgrade, 1999; Galloway et Depledge, 2001; Auffret, 2005; Selgrade, 2005).

But aquatic immunotoxicology still lacks investigations focusing on the study of confounding factors of these immune endpoints to be used in risk assessment (IPCS, 1996, 2001; Selgrade, 2005). Indeed, the reproductive cycle of bivalves, especially spawning, was supposed for a long time to be related to changes of immunocompetency (Cartier *et al.*, 2004; Soudant *et al.*, 2004; Lemaire *et al.*). But the recent comparison of two batches of oysters differing from their reproductive efficiency (triploids and diploids) as the adjunction of sex and gametogenesis assessment has demonstrated that immune parameters were varying with sex and stages of gametes development (Duchemin *et al.*, 2007). A number of environmental factors draw also changes in immune endpoints such as temperature (Feng et Feng, 1974; Fisher, 1988; Hégaret *et al.*, 2003a, 2003b; Gagnaire *et al.*, 2006a), salinity (Auffret et Oubella, 1995; Gagnaire *et al.*, 2006a) or algal diets (Delaporte *et al.*, 2003; Hégaret *et al.*, 2004; Delaporte *et al.*, 2005). Therefore, seasons, which can be seen as combinations of changes in environmental and endogenous factors, are confounding factors of immunotoxicological endpoints and must be taken into account for such studies.

Finally, the chemical impact of human activities on estuarine ecosystems may depend on the seasonal rhythms of certain activities, and on the pattern of the different activities occurring at one site. But it is still not clear whether chemicals induce different immunotoxic effects depending on their concentration in the water column or on the point on the reproductive cycle or both. Only a few studies have focused on the combination of environmental factors changes and immune responses in bivalves (Nieto-Fernandez *et al.*, 2000; Parry et Pipe, 2004). To investigate the season and chemical impact factors on individuals' immune endpoints, a short-term individual exposure design had to be chosen. The "in tubo" exposure design showed the immunotoxicity of mercury chloride on 24 h of individual exposures. More, this design offers enhanced chemical safety for studying the toxic effects of the previous four chemicals listed on Canadian and European black lists.

The current study investigated the immunotoxic impact of three human activities occurring in estuaries through three test concentrations modelling low, medium and heavy impacts. In the first place, these impacts were investigated alone but at two different time periods in accordance to the

mussel's reproductive cycle in Québec: summer and autumn. Secondly, the chemical impacts of different patterns of human basins were investigated in autumn, modelled as five mixtures of different formerly tested solutions of the four previous chemicals.

## 2. Material and methods

### 2.1. Mussels

Before each exposure, mussels, *Mytilus edulis*, were collected at Metis Beach (Quebec, Canada) which is free of anthropogenic activities (sewage outputs or harbour activities). Mussels were transported to our experimental facility in a cool box and placed into acclimation water tanks and were fed to satiety with a monoculture of phytoplankton daily for six days until exposure.

### 2.2. Chemicals

Three test concentrations were used for TBT, atrazine and diuron but only two for E2. Each test solution was obtained from serial dilution into filtered seawater of one working solution for each chemical. The working solution was prepared in glass ware and the chemical was firstly diluted with ethanol (Sigma Aldrich 100 %). TBT (Sigma-Aldrich, purum grade  $\geq 96\%$ ) was tested for immunotoxic effects at  $0.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ , and  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Atrazine was tested at  $0.8 \mu\text{g.L}^{-1}$ ,  $8 \mu\text{g.L}^{-1}$ , and  $80 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Diuron was tested at  $0.07 \mu\text{g.L}^{-1}$ ,  $0.7 \mu\text{g.L}^{-1}$ , and  $7 \mu\text{g.L}^{-1}$ . E2 was tested at  $10^{-10}\text{M}$  and  $10^{-8}\text{M}$ . A solution of maximum possible ethanol concentration (0.01%) diluted into filtered seawater was prepared as the control.

### 2.3. Mixtures of chemicals

In October 2005, 15 mussels have been challenged by a combination of the former chemicals considering the tested concentrations under in tubo scheme. Control treatment was filtered seawater with the maximum vehicle concentration and a control was systematically set up for each new trial. In this work, five mixtures were tested (Table 10).

### 2.4. Individual "in tubo" exposure

In October and in June 2005, the exposures have been performed as previously developed by Duchemin et al. (submit). After acclimation in tanks mussels were transferred individually into 50 mL falcon® polypropylene tubes with 30 mL seawater. After 2 hours, the seawater was gently removed and replaced with a syringe by 30 mL of contaminated seawater solution. Each tube was placed in a hole of a pierced board and the board was partly immersed in a 150 L tank so that every tube was plunged into the water (fig. 1). The tank was supplied with circulating seawater at the

ambient temperature of the sampling site. Seawater temperature in tubes was recorded in a 30 mL seawater mussel-free tube. Therefore, each tube could be considered as an experimental replicate. For each test concentration 15 experimental units were per se exposed for 24h.

### 2.5. Clearance rate

To monitor the gross physiological condition of the mussels, clearance rate was measured after 24h of in tube exposures with an indirect method, the reduction of algal cells as described by Duchemin et al.(submitted). The algal solution (T-iso) was used for all acclimation and feeding phases. A working solution of  $2 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup> was prepared. After the exposure period, the treated solution was gently removed from the tube and replaced by 30mL of the working solution of algal cells. After 20 min of filtering, 900 µL of the algal solution was removed into a 5 mL falcon® tube with 100 µL paraformaldehyde (10% final concentration). Three sedimentation control tubes were also sampled. Algae counting were performed on the red PMT of a Facscalibur cytometer (Becton-Dickinson).

### 2.6. Hemolymph withdrawal

For each individual sampled, hemolymph was withdrawn from the anterior adductor muscle sinus, with a 2 mL syringe and a 21G needle. A millilitre was collected from each individual and transferred into 1.5 mL plastic tubes and stored on ice before analysis. All analysis was performed individually as follows:

### 2.7. Haemocyte mortality

Propidium iodide (PI) is membrane impermeable and therefore is excluded from viable cells and fluoresces in the red when bond to DNA. In a 5 mL Falcon® tube, 50 µL of hemolymph (collected from treated individuals or from treated pools) to be analysed was poured into 250 µL of anti-aggregating solution (HAAS pH = 6.7; Osmolarity = 920 mOsm.kg<sup>-1</sup>) according to Auffret and Oubella (1994). PI was added to a final concentration of 10 µg.mL<sup>-1</sup> and tubes incubated 10 min at 4 °C in the dark before flow cytometry analysis was undertaken within the hour (Brousseau *et al.*, 1998). The fluorescence level was measured on FL3 photodetector and further analyzed with CellQuest® (Becton-Dickinson) software. The percentage of haemocytes that had incorporated PI was used to measure haemocyte mortality.

### 2.8. Total haemocyte counts (THC)

THC was assessed by flow cytometry (Facsan® Becton Dickinson) from the former



hemocyte preparations. The flow cytometer was operated with PBS (400 mOsm.kg<sup>-1</sup>) as sheath fluid. The flow rate was measured to allow absolute cell counts and the cells were counted arbitrarily for 52s.

### 2.9. Phagocytic index and Haemocyte Phagocytic Capacity

The phagocytosis assay was performed *ex vivo* as described by Auffret et al. (2004), a protocol slightly modified from Brousseau *et al.* (Brousseau *et al.*, 1998). In summary, a hundred microlitre of each individual hemolymph was deposited into the well of a 96-well microplate. Haemocytes were put then into contact with a solution of 2 µm fluorescent latex beads (Polysciences®, GmbH) according to a bead:haemocyte ratio of 30:1. After gentle centrifugation (4 °C, 300 g, 10 min.), the microplate was incubated for 4 h at 15 °C in the dark. To detach the cells from the well walls, HAAS complemented with trypsin (0.5 g.L<sup>-1</sup>) was finally added and the microplate was agitated for 5 min. The content of each well was then transferred into cytometry tubes before flow cytometry analysis (Facsan® , Becton-Dickinson). Based on fluorescence two phagocytic parameters were calculated from CellQuestPro ® (Becton-Dickinson) software. The phagocytic index was the relative number of haemocytes that has engulfed at least 3 beads. The haemocyte phagocytic capacity (HPC) was calculated as the mean number of engulfed beads within the phagocytic haemocytes population (Lehmann *et al.*, 2000).

### 2.10. Sex and sexual maturation determination

Gonadal tissue was sampled in the mantle of the dorsal (right) valve and put in Bouin's fixative solution for 48h. Gonad samples were then dehydrated and embedded in paraffin® through an automatic carousel. Sections of 5 µm were cut from the samples and put on slides. Haematoxylin-eosin coloration was used to observe germinal structures. Sex and sexual maturation were defined according to the commonly used five-stage classification (Lubet, 1959; Gosling, 2003) as follows: (0), resting period; (1), initiation of gametogenesis; (2), gonadal maturation stage; (3), final maturation stage; (4), spawning stage.

### 2.11. Data management and statistical analysis

The effects of toxicant doses, the sex and the time of the year on the immune system were analysed. But for the dose factor only significant differences from CTR mussels were taken into account. Normal distribution of variables was checked from the Kolmogorov-Smirnoff's test. THC haemocytes' mortality and HPC were Log-transformed to meet the assumptions of parametric tests. A MANOVA (doses, seasons, and sexes) was performed on all variables but the clearance rate. The

Kruskall-Wallis' non parametric test was performed to look at the effects of the three factors on the clearance rate. All tests were performed at  $p = 0.05$  except when specified.

### 3. Results

#### 3.1. Gametogenic stages

In October 2004, when the decreasing mean seawater temperature during the experiments was  $8 \pm 1^\circ\text{C}$ , mussels' gonads were drawing final stages and first stages of gametes. In June 2005, when the increasing mean seawater temperature during the experiments was  $7.5^\circ \pm 0.5^\circ\text{C}$  mussels' gonads were mainly at stage 3 and 4 of gametogenic maturation (Fig 36).

#### 3.2. Single exposure to TBT

In October 2004, TBT induced a stimulation of THC within 24 h at  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Figure 5.2). That same dose provoked an inhibition of the phagocytic index and HPC in both males and females and in both seasons, sex taken as a whole (Figure 37). However, TBT did not draw changes in haemocyte mortality whatever the dose, sex and season.

#### 3.3. Single exposure to atrazine

Whereas the clearance rate was not significantly different regarding the three factors, considering only the females, the clearance rate was significantly lower in June than in October. Whether the dose-response curves of THC did not show any significant differences among doses or sex, THC was significantly higher in October than in June (Fig 38). Haemocytes mortality did not show any significant differences among the three factors. Nevertheless, the dose-response curves are not the same regarding sex, but the male's dose-response curve in October follows the female's, in June and reversely (Fig 38). In October, the highest atrazine dose ( $80 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) drew a significant ( $p < 0.05$ ) decrease of the phagocytic index in males whereas atrazine did not impair this endpoint in females and in June in both sexes (Fig 38). The same response was drawn by HPC. But, conversely to the phagocytic index dose-response curves, it is the lowest atrazine concentration that induced a significant ( $p < 0.05$ ) increase of the number of engulfed beads in October's males (Fig 38).

#### 3.4. Single exposure to diuron

Diuron exposures did not impair the clearance rate of mussels but it drew immunotoxic effects. THC of mussels was significantly higher in October than in June ( $p < 0.05$ ). In October, the two highest doses of diuron drew also a significant decrease of THC in males while the same dose-

response curve was observed in females but no significant differences appeared. Finally, both sexes did not draw significant different THC (Fig 39). Haemocyte mortality did not show any difference regarding the three factors (Fig 39). The phagocytic index was dramatically lower in June than in October ( $p < 0.05$ ). The dose-response curves differed also between both October and June in males. While diuron drew any impairment in October, it induced a continuous increasing of the phagocytic index in June significantly due to severe immunotoxic effects (Fig 39). As for the phagocytic index, HPC was significantly higher in October than in June.

### 3.5. Single exposure to E2

In October 2004, the clearance rate was significantly higher than in June 2005 but no differences occurred among sexes and doses (Fig 40). Males in October exert significantly higher THC than females in October and both sexes in June. But a dose of  $10^{-10}$ M stimulated significantly THC in June's males while no differences appeared in female (Fig 40). Haemocyte mortality did not show any differences among seasons and doses but sexes. Haemocyte mortality in females sampled in October was significantly higher than in males (Fig 40). The phagocytic index did not show any significant differences among doses and sexes but the phagocytic index of mussels exposed in June was significantly higher than the mussels exposed in October (Fig 40). Males exposed in October drew a significant lower HPC than all the other mussels and drew significant depressed HPC at  $10^{-8}$ M (Fig 40).

### 3.6. Exposures to mixtures

In autumn, mixtures D and E induced a 2.5 times increase of THC ( $p < 0.05$ ) compared to the control while the other mixtures did not induce any differences (Fig 41A). Haemocyte mortality was 4 times higher in mixtures B and C ( $p < 0.05$ ) than in the other mixtures (Fig 41B). The different mixtures did not draw toxic effects on the phagocytic index (Fig 41C), however mixture C inhibited significantly 40% of control HPC and, with mixture B, were nearly 50% of mixture D HPC (Fig 41D).

## 4. Discussion

### 4.1. Dose-response curves of TBT, atrazine, diuron, and E2

Every single toxicant drew some immunotoxic effects with in tubo exposures compared to controls.

TBT inhibited 35% of phagocytosis and stimulated by 85% THC at  $5 \mu\text{gL}^{-1}$ . TBT *in vitro* exposures of haemocytes has already shown inhibition of phagocytosis at this dose but in

*Macromeris polynyma* and in *Mya arenaria* while the inhibition occurred at 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$  in *Mytilus edulis* (Bouchard *et al.*, 1999). Conversely, tributyltin oxide did not alter the phagocytosis of haemocytes in *Mytilus edulis* exposed *in vivo* for seven days at doses as high as 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  while it induced cytotoxic effects (neutral red assay) above 0.5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Hagger *et al.*, 2005). Yet, the former study do not give any precision on size and gross physiological condition of the sampled mussels. The mechanism of TBT toxic effects on phagocytosis reside in the alteration of the calmodulin, a  $\text{Ca}^{2+}$  transporter, and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity as it has been shown in turnicats (Cima et Ballarin, 2004). In the current study, exposure of individuals to TBT has caused global immunotoxic effects on phagocytosis.

Atrazine impaired phagocytosis (phagocytic index and HPC). Only peroxidase activity was impaired in *Crassostrea gigas* facing *in vitro* and *in vivo* exposures of atrazine (Gagnaire *et al.*, 2003) and every doses of atrazine, starting at 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , induced an increase in haemocyte density within 96 h of *in vivo* exposures of *Lymnea stagnalis* and a significant inhibition of phagocytosis within 24 h (Russo et Lagadic, 2004). Similar results was shown here with the decrease of the phagocytic index starting at 0.8  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , but the current study investigated further phagocytosis impairment providing evidence of a stimulation at that dose of atrazine followed by an inhibition of the efficiency of haemocytes to perform phagocytosis.

In this study diuron impaired THC and phagocytic index but not HPC. Diuron was known to severely impair several PFC responses in mice (Couderc *et al.*, 1983) but no other data provide evidence of cellular effects on aquatic fauna. Yet diuron induces differential gene expression in *Platichthys flesus* (Marchand *et al.*, 2006) and in *Crassostrea gigas* (Tanguy *et al.*, 2005). Here, whereas in tube diuron exposure revealed no cytotoxic effects, the number of circulating hemocytes increased. THC changes were already shown in molluscs to be induced by chemicals (Russo et Lagadic, 2004), heavy metals (Fournier *et al.*, 2001) or environmental factors (Auffret et Oubella, 1997). Diuron also impaired phagocytosis, by increasing the number of phagocytosing haemocytes among the whole haemocyte population. Subpopulations of haemocytes are usually present in the haemolymph of molluscs, commonly known as large and small granulocytes, and hyalinocytes (Cheng, 1981; Auffret, 1988; Hine, 1999). These haemocytes happen to draw different immune parameters, especially granulocytes are the most active cells in phagocytosis (Pipe *et al.*, 1997; Pipe *et al.*, 1999; Goedken et De Guise, 2004). But in this study, diuron made the number of circulating haemocytes decreased while it was increasing the number of phagocytes. Consequently, we can assume that this herbicide has killed within 24 h the less phagocytosing cells, the hyalinocytes, or it has stimulated the phagocytic function of these latter. The second hypothesis is more likely since haemocyte mortality did not show any changes with doses.

E2 draw also impairment in THC and in HPC, but not in the phagocytic index. This endocrine disrupter impairs phagocytosis and lysosomal stability of haemocytes in *Mya arenaria* and *Mytilus edulis* challenging *in vivo* exposures (Gauthier-Clerc *et al.*, 2006b; Canesi *et al.*, 2007). Furthermore, *in vitro* exposures of haemocytes in *Mytilus edulis* to similar doses of E2 rapidly changes intracellular  $[Ca^{2+}]$  which is related to phagocytosis via MAP kinase cascade (Canesi *et al.*, 2004a). These intracellular changes induced a stimulation of the phagocytic activity after 24 h of *in vivo* exposures and an inhibition at higher doses, in *Mytilus edulis* (Canesi *et al.*, 2006). However, in the present study  $10^{-10}$ M of E2 drew also an increase of THC that is 100 times below the dose altering phagocytosis. Finally, these immunotoxic effects are enhanced by 1 000 times with exposures to other xenoestrogens from chemicals residuals or pharmaceuticals or personal care products (Canesi *et al.*, 2004b).

#### 4.2. Immunotoxic effects of mixtures

In this work, five mixtures were tested (Table 6), and several induced various immunotoxic effects. Globally, these effects did not reflect those observed after single exposures. Three models of toxic effects of mixtures exist presently. The first model states that a mixture exerts toxic effects as an addition of the toxic effects of the components. The second states that the most toxic component draws the toxic effects of the mixtures. Conversely to the former models, the third one defines the toxic effects of each components interacting together provoking antagonist or synergistic effects. These models depend on the mode of action of the different components (Escher *et al.*, 2005). Obviously, in the current study the third model appeared to be valid. THC of individuals exposed to mixtures D and E was increased. TBT and E2 doses are identical in these two mixtures while atrazine and diuron differ. However, the dose of TBT did not significantly increase THC as a single exposure. We assume that synergistic effects have occurred here. Nevertheless, mixture B drew similar doses of TBT and E2 without showing similar effect on THC. Looking for differences in doses of atrazine and diuron among mixtures B, D, and E did not offer further explanation. Mixtures B and C was the two most cytotoxic of all tested mixtures since haemocyte mortality was the highest. Here again, searching for an explanation by looking at the doses did not happen to be successful. The phagocytic index of haemocytes was not affected by any of the tested mixtures but mixture C drew 50% of inhibition of HPC and this decrease may be mainly due to E2 since this mixture is the only one depicting the highest dose tested in single exposures.

The aim of investigating immunotoxic effects of these four chemicals was to approximate real

mixtures in anthropogenic sites. Therefore these mixtures can be seen as five models of sites of human activities, modelling a small estuary (mixture A), two ports differing by the use of diuron in the antifouling paints, with E2 water treatment plant downstream a shredder outside the period of pesticide spreading (mixture B and E), the same site as mixture B, during spreading (mixture C), same site as mixture B, during spreading but without a E2 water treatment plant (mixture D). According to this approach this study showed the importance of considering E2 water treatment for every city.

#### 4.3. Impact of sex and seasons on immunotoxic effects

Apart from the immunotoxic effects, this study aimed to investigate the impact of seasons and sex on haemocytes immune parameters. Except for TBT, all chemicals drew differential effects in autumn or in spring. Atrazine and E2 delivered immunotoxic effects in October but did not in June. Conversely, diuron impaired THC in October and the phagocytic index in June. Furthermore the immune parameters were significantly differing between these two seasons. Seasons are a combination of exogenous and endogenous changes. Here the seasons varied by the gametogenic stages and by the decreasing or increasing changes of seawater temperature. Immune parameters of mussels were also changing month after month at several producing sites in the Gulf of Saint Lawrence (Cartier *et al.*, 2004; Lemaire *et al.*, 2006) and in *Crassostrea gigas*, these changes were mainly related to spawning (Duchemin *et al.*, 2007).

But in the current study, as in this last study in the Pacific oyster, the addition of sex determination provided evidence of sex differential immunotoxic effects. Thereby, chemicals do not impair equally males and females within a population and could lead to unbalance it as a first consequence on aquatic ecosystems. Even if presently the link between changes in immune parameters and pathogens susceptibility is not fully confirmed (Oliver et Fisher, 1999; Adamo, 2004), these current results should be considered. Moreover, our study assumed the endocrine disrupting effects of atrazine and diuron.

Combining the impact of season and of sex on the immune sensitivity to chemicals, endogenous explanations have to be found. E2 is an endogenous hormone produced in mussels gonadal tissues (Zhu *et al.*, 2003) and in other bivalves such as *Mya arenaria* (Gauthier-Clerc *et al.*, 2006a) to play a role in gametogenesis. In vertebrates, E2 is known to immunomodulate immune cells (Weyts *et al.*, 1999; Fournier *et al.*, 2000b) and to induce changes in ganglionic microglial cells in mussels. Recently, E2 receptors have been observed by Western blot at the membrane surface and in the nucleus of haemocytes in *Mytilus edulis* (Canesi *et al.*, 2004a). Consequently, the

immunotoxic effects of E2 may be related to the occurrence of these receptors and sex or season differential effects are likely to be related to differential plasmatic levels of endogenous E2 (Siah *et al.*, 2003; Gauthier-Clerc *et al.*, 2006a). However, a differential expression of E2 receptors throughout sex and year is now a new hypothesis to be considered.

## **5. Conclusion**

Several points aroused of this study. Firstly, assessing several immune endpoints in immunotoxicological studies is critical. Especially, the phagocytic index and the haemocyte phagocytic capacity happen to be distinct and offer complementary mechanistic information on toxicants. Indeed, a tier approach exerts the lack of knowledge in bivalves' immune function. Secondly, this study has improved our knowledge in invertebrates' immunotoxicology with the findings of toxicants that do not aim the immune system but still draw sex and seasons differential immunotoxic effects. Finally, this study has improved the relevance of using the "in tubo" exposure design enhancing chemical safety.

Tableau 11 : Mixtures of TBT, atrazine, diuron, and E2.

	<b><i>TBT</i></b> <b><i>(<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</i></b>	<b><i>Atrazine</i></b> <b><i>(<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</i></b>	<b><i>Diuron</i></b> <b><i>(<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</i></b>	<b><i>E2</i></b> <b><i>(<math>\text{mol.L}^{-1}</math>)</i></b>
<b><i>Mixture A</i></b>	0.05	0.8	0.07	0
<b><i>Mixture B</i></b>	50	8	0.7	$10^{-10}$
<b><i>Mixture C</i></b>	50	80	7	$10^{-8}$
<b><i>Mixture D</i></b>	50	80	7	$10^{-10}$
<b><i>Mixture E</i></b>	50	0.8	0.07	$10^{-10}$



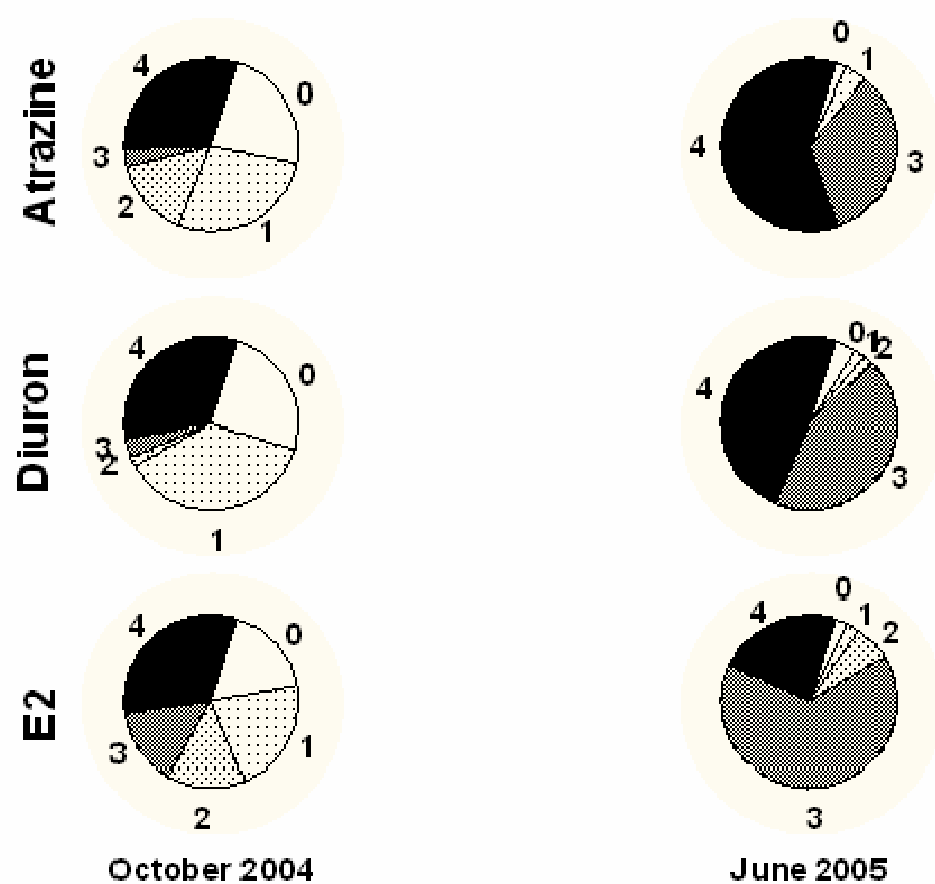


Figure 5.1 : Diagram of gametogenic stages of all individuals sampled for each exposure in October 2004 and in June 2005.

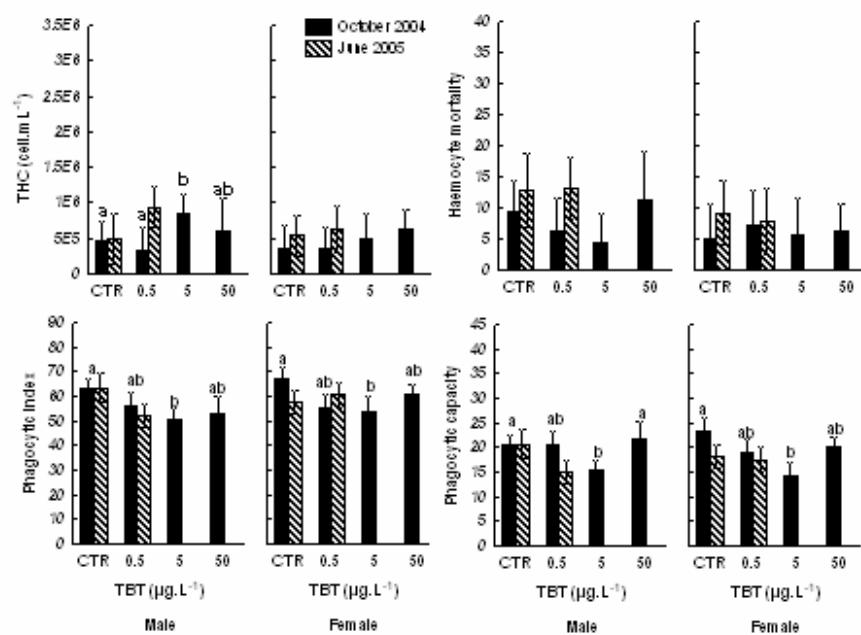


Figure 5.2 : THC, haemocyte mortality, phagocytic index, and HPC immunotoxic effects of TBT on individually exposed mussels for 24 h regarding seasons and sex. Latin letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) within a dose-response curve.

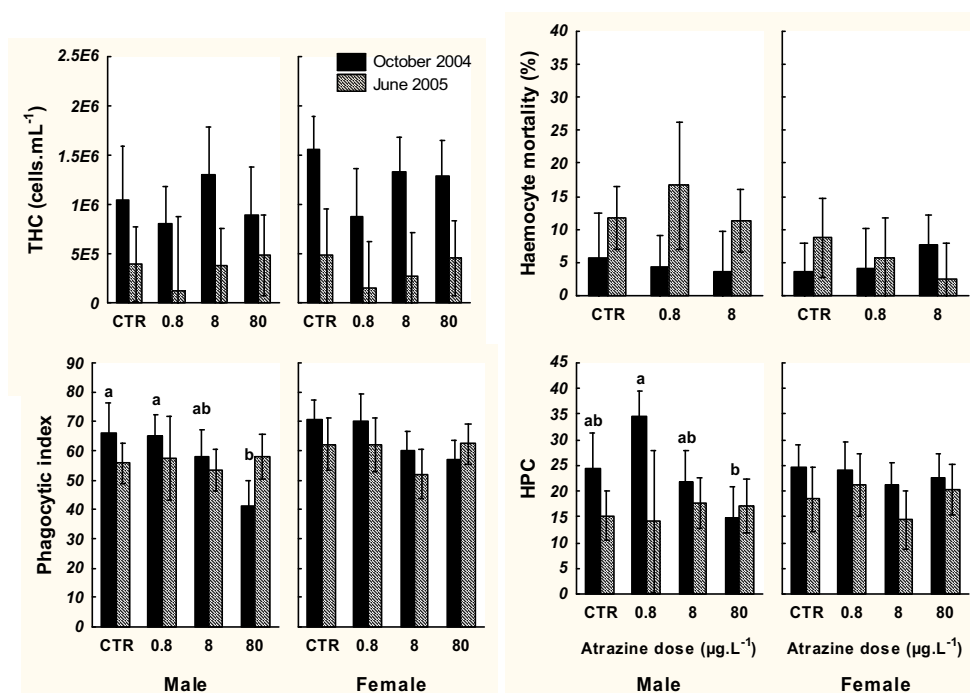


Figure 5.3 : Clearance rate and immunotoxic effects of atrazine on individually exposed mussels for 24 h regarding seasons and sex. A. Clearance rate. B. Total Haemocyte Counts. C. Haemocytes mortality. D. Phagocytic index. E. Haemocytes Phagocytic Capacity. Latin letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) within a dose-response curve. Stars (\*) indicate significant CTR seasonal differences and crosses († and ‡) indicate significant sex differences.

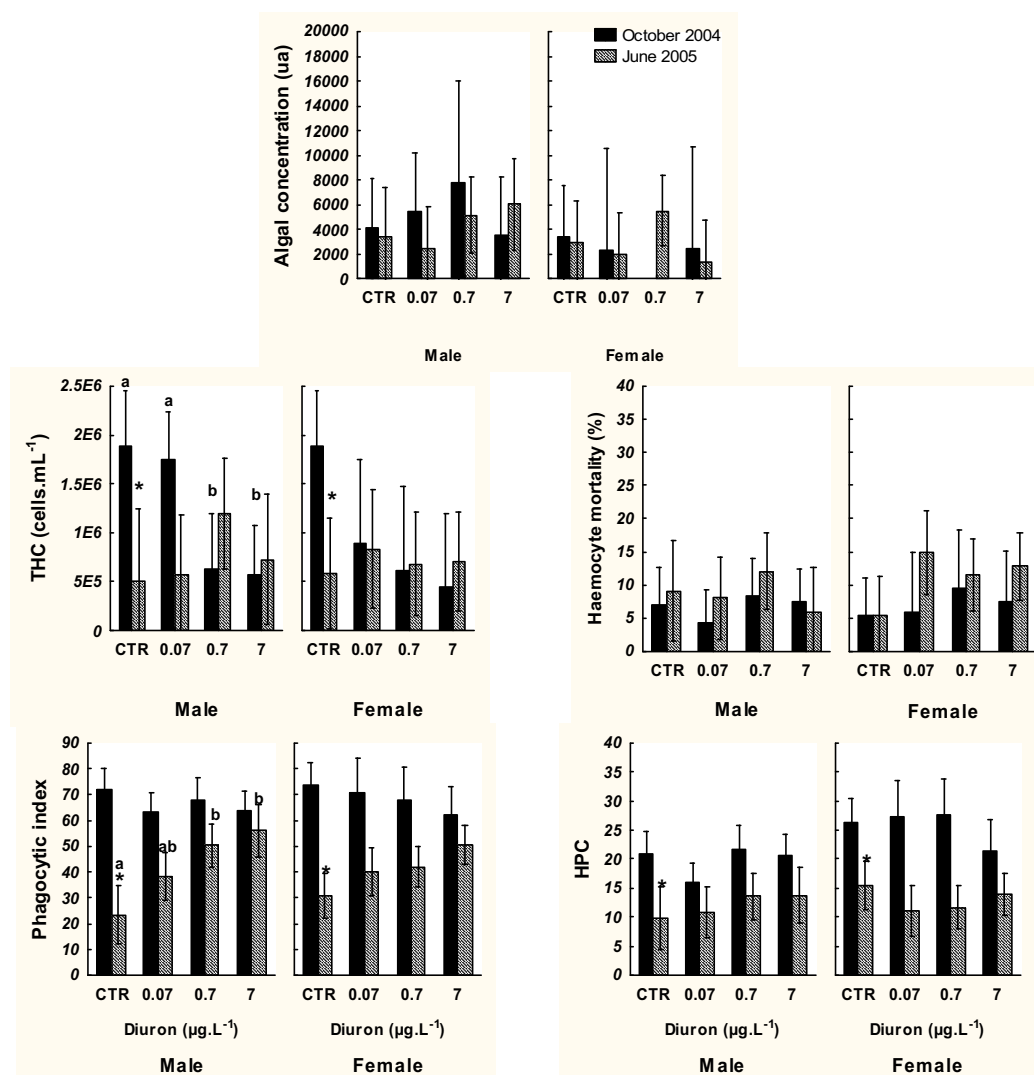


Figure 5.4: Clearance rate and immunotoxic effects of diuron on individually exposed mussels for 24 h regarding seasons and sex. A. Clearance rate. B. Total Haemocyte Counts. C. Haemocytes mortality. D. Phagocytic index. E. Haemocytes Phagocytic Capacity. Latin letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) within a dose-response curve. Stars (\*) indicate significant CTR seasonal differences and crosses († and ‡) indicate significant sex differences.

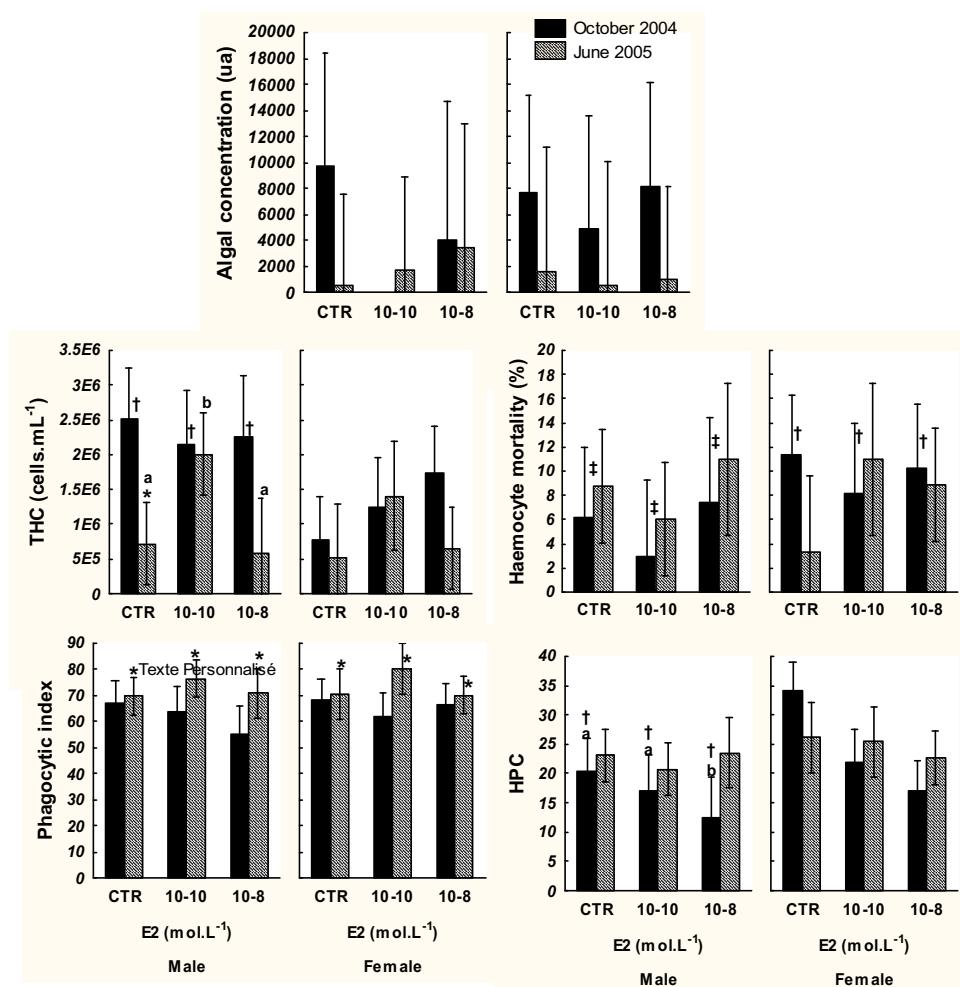


Figure 5.5 : Clearance rate and immunotoxic effects of E2 on individually exposed mussels for 24 h regarding seasons and sex. A. Clearance rate. B. Total Haemocyte Counts. C. Haemocytes mortality. D. Phagocytic index. E. Haemocytes Phagocytic Capacity. Latin letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) within a dose-response curve. Stars (\*) indicate significant seasonal differences (October 2004 and June 2005) for same dose and sex. Crosses († and ‡) indicate significant sex differences.

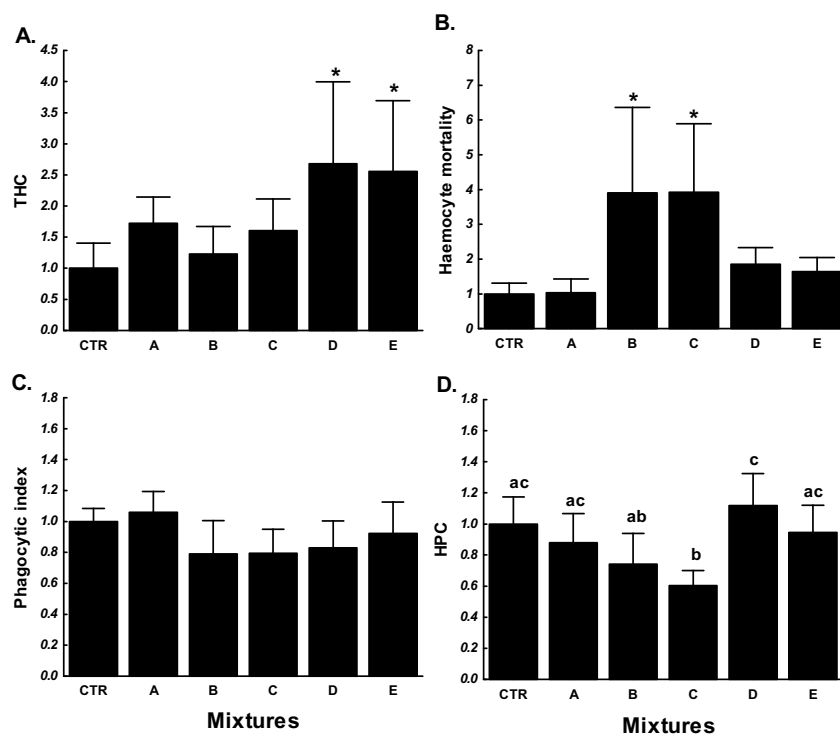


Figure 5.6 : THC (A), haemocyte mortality (B), Phagocytic index (C), and HPC (D) of 15 mussels challenging different anthropogenic mixtures of TBT, atrazine, diuron and E2. Bars are the confidence interval at 95%. Stars (\*) and different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).



### III. Synthèse

Ce chapitre avait pour objectif de mettre en condition opérationnelle les résultats des chapitres précédents.

Tout d'abord, l'évaluation d'effets immunotoxiques à l'aide de plusieurs paramètres reste capitale, notamment en ce qui concerne l'évaluation de la phagocytose des hémocytes par deux paramètres : l'indice phagocytaire et la capacité de phagocytose. Cette approche apparaît comme complémentaire pour la compréhension mécanistique des effets immunotoxiques des polluants issus des activités anthropiques. En exposition seule, l'oestradiol a démontré son rôle critique dans la perturbation des paramètres immunitaires.

Deuxièmement, des expositions individuelles de moules à des doses actuellement mesurées dans l'environnement de substances chimiques d'origine anthropique l'utilisation de scénarii d'exposition ont induits des effets immunotoxiques. L'évaluation du risque chimique en évaluant les effets dans des conditions réalistes d'exposition a révélé le degré de sensibilité des biomarqueurs du système immunitaire.

Troisièmement, l'exposition à des mélanges raisonnés des quatre contaminants préalablement étudiés a montré des effets plus complexes à mettre en évidence. Une connaissance des composés majeurs des mélanges d'intérêt est toujours indispensable à l'évaluation environnementale d'un site. L'oestradiol a aussi démontré son rôle critique dans l'immunotoxicité d'un mélange.

Enfin, la prise en considération du sexe permet de diagnostiquer les effets immunotoxiques d'un polluant dont le signal aurait été brouillé autrement. Alors que les paramètres immunitaires varient en fonction de la période de l'année, ce chapitre a de plus montré des différences significatives de sensibilité aux xénobiotiques selon la saison. Ces deux facteurs endogènes et saisonniers doivent impérativement être pris en compte dans l'évaluation du risque environnemental de polluants.





# *Chapitre 6.*

## *Discussion générale*

---

<b>I. DU DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE</b>	<b>227</b>
<b>II. DE L'IMPACT DES FACTEURS SAISONNIERS</b>	<b>230</b>
<b>III. DES IMPACTS DES XENOBIOTIQUES DES ACTIVITES ANTHROPIQUES</b>	<b>233</b>
<b>IV. RECOMMANDATIONS POUR L'EVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL UTILISANT LES OUTILS IMMUNOTOXICOLOGIQUES</b>	<b>234</b>



## **1. Du développement méthodologique**

Ces travaux ont porté leur attention sur que la variation individuelle des paramètres immunitaires. La stratégie était de comparer des méthodes d'analyse de ces paramètres ou de développer un modèle d'exposition en le comparant à ceux existant déjà, en utilisant une substance immunotoxique connue, le chlorure de mercure, comme référence.

Le protocole « in tubo » est une alternative méthodologique à l'évaluation toxicologique en milieu aquatique d'une molécule, en réponse aux inconvénients des méthodes *in vivo* et *in vitro*, classiquement utilisées. En effet, il offre des conditions d'exposition individuelle rigoureusement identiques à chacun des animaux testés. Il permet d'évaluer, par l'activité de filtration, la condition physiologique globale, avant et après exposition. Cette méthode a en outre l'avantage d'être non invasive et de réduire au maximum l'état de stress des animaux par rapport à l'exposition. Enfin, le protocole in tubo offre des conditions opératoires optimum en réduisant les quantités de toxiques à manipuler lors de la préparation des contaminants. Néanmoins, ce protocole est opérationnel sous la limite de 24 h d'exposition. Cette contrainte de temps pourrait être le fait de l'accumulation de déchets métaboliques toxiques de ces animaux ammoniotèles, dans un milieu confiné. En standardisant au maximum les conditions d'exposition, les réponses immunotoxiques mesurées à l'aide de ce protocole présentaient, toujours, une variabilité importante, confirmant son caractère intrinsèque aux bivalves.

Après les conditions d'exposition, les méthodologies pouvaient être un facteur explicatif à ces variations. Ainsi, la comparaison de méthodes d'analyse de la phagocytose a montré leur similitude en travaillant sur le même matériel biologique à une même exposition au chlorure de mercure (PhagoBIM). Par contre, en travaillant dans des conditions opératoires optimales, mais avec un pool d'hémolymphe issu d'individus de populations différentes, la comparaison des méthodes a montré des résultats moins convergents pour les fortes doses de chlorure de mercure (PhagoBIM at home). Ces activités entre laboratoires mettent en évidence souvent une différence de politique d'assurance qualité dans ces laboratoires (Forbes et Forbes, 1997). Néanmoins, à ces fortes doses provoquant inévitablement des mortalités chez les individus après 24 h d'exposition « in tubo », la différence de réponse entre les

méthodes observée suggère une variabilité dans la réponse des survivants à l'exposition *in vitro*. Or, le paradigme actuel est de considérer, à partir de différentes expérimentations, trois types d'« efficacité » du système immunitaire : bas, moyen ou élevé, c'est-à-dire établissant qu'un facteur génétique peut expliquer ces variations interindividuelles. Ainsi, des mesures du nombre d'hémocytes circulants chez la palourde, *Ruditapes philippinarum*, répétées chez les mêmes individus, à quelques mois d'intervalles, ont montré, en laboratoire, une constance dans le niveau relatif des réponses : certains individus présentaient toujours les valeurs les plus élevées et d'autres toujours les valeurs les plus faibles. De plus, cette étude a montré que le rapport entre les variations inter et intraindividuelles étaient similaires à celles trouvées dans la population humaine (Ford et Paillard, 2007). L'étude approfondie des réponses, statistiquement non significatives, dues à un intervalle de confiance trop grand, pourrait mettre en évidence des comportements précoces interindividuels différents. Le suivi individuel des paramètres immunitaires, avant et après contamination, permettrait de mieux comprendre le déterminisme de ces variations.

Les études immunotoxicologiques sur les bivalves utilisent des hémocytes prélevés sur deux sites anatomiques différents. Dans les présents travaux, occultant cette variabilité individuelle, en mettant en commun l'hémolymphe de plusieurs individus de lots homogènes, une différence d'activité de phagocytose, corrélée à l'existence de schémas de répartition des sous populations hémocytaires différents, a été mis en évidence. Outre l'importance critique du site de prélèvement pour l'évaluation des réponses immunitaire que ces résultats indiquent, les différences de fonctions entre ces sites et les patterns hémocytaires peut être discuté. Cytologiquement, les sous populations hémocytaires se distinguent, usuellement en hyalinocytes, grands et petits granulocytes et cellules séreuses, ces dernières étant présents principalement dans la cavité péricardique (Cheng, 1981; Auffret, 1988; Hine, 1999). Les granulocytes sont le plus souvent associés à la fonction de phagocytose chez *Mytilus edulis* et chez *Crassostrea virginica* (Pipe *et al.*, 1997; Pipe *et al.*, 1999; Goedken et De Guise, 2004) alors que les hyalinocytes pourraient être liées davantage à la production de facteurs sériques microbicides (Mitta *et al.*, 2000) et les cellules séreuses aux fonctions excrétrices (Hine, 1999; Bachère *et al.*, 2004; Ottaviani, 2006). De plus, les hémocytes peuvent assumer d'autres fonctions, comme le transport de nutriments ou la réparation et la croissance de la coquille (Fisher, 1986; Bachère *et al.*, 2004), mais là encore, le processus cellulaire en jeu reste la phagocytose, fonction cellulaire atavique (Fisher, 1988). En conséquence, les résultats

obtenus suggèrent que les différentes fonctions assumées par la cavité péricardique et par le sinus du muscle adducteur, lieu de transit des hémocytes, seraient associées à des patterns de sous populations hémocytaires assumant, eux-mêmes, des fonctions différentes.

L'évaluation multiparamétrique des paramètres immunitaires pour le diagnostic environnemental gagne en pragmatisme avec l'utilisation d'un outil synthétique mathématique des outils immunotoxicologiques. Néanmoins, cet outil, seul, ne peut suffire à l'expertise. Premièrement, il masque les variations de chacun des paramètres immunitaires (Broeg et Lehtonen, 2006). Or, actuellement, l'approche statistique des variations de ces paramètres et des relations entre ces paramètres n'ont pas encore été étudiées en tant que telles. Ainsi dans tous les travaux présentés dans ce mémoire, des relations statistiques existent entre tous les paramètres mesurés, mais aucune n'est convergente. De même, la distribution des paramètres analysés, à l'exception de l'activité de phagocytose, pouvait être normal ou non. Le facteur explicatif le plus évident, alors, étant l'expérimentation en elle-même. La multiplication des observations sur une même espèce sur plusieurs cycles annuels, permettrait de comprendre mieux, statistiquement, le comportement de ces variables et éventuellement de les pondérer de manière objective dans l'index multiparamétrique. Deuxièmement, le lien entre système immunitaire et susceptibilité à la maladie déséquilibrant l'écosystème n'est pas fait (Adamo, 2004), notamment du fait d'un manque de connaissances de l'impact des facteurs saisonniers et endogènes sur la réponse immunitaire (Oliver et Fisher, 1999), mais aussi de la précocité des perturbations détectées par ces outils. Néanmoins, une comparaison avec des outils écologiques validés pour l'évaluation environnementale en milieu marin s'avérerait très riche d'enseignement. En conséquence, ce calcul est un outil d'aide à la décision qui rend compte du degré de perturbation global du système immunitaire des organismes sentinelles. Par extension, l'induction de tels effets biologiques est révélatrice d'une dégradation de la qualité de l'écosystème estuarien et marin côtier. Enfin d'autres approches d'évaluation environnementale privilégient des études multicompartiments, en considérant les réponses des biomarqueurs de plusieurs espèces modèles de l'écosystème aquatique, comme le Rapid Assessment of Marine Pollution (Moore *et al.*, 2004; Bowen et Depledge, 2006; Galloway *et al.*, 2006). Dans la suite logique des ateliers comparatifs menés pendant ces trois années, la confrontation de ces outils mathématiques devient également nécessaire.

## II. De l'impact des facteurs endogènes et saisonniers

Les saisons, pendant ces travaux, se sont révélées être des facteurs confondants forts des outils immunotoxicologiques chez l'huître creuse, comme chez la moule bleue, pouvant entraîner des différences de 50% d'activité de phagocytose entre les mois, notamment pendant la période de ponte (Tableau 7). Des suivis de paramètres immunitaires avaient montré sur quelques semaines, chez *Mytilus edulis*, l'impact potentiel de la reproduction sur la chute de phagocytose (Cartier *et al.*, 2004; Lemaire *et al.*, 2006), mais les résultats obtenus dans cette étude sur l'immunité, le stade de maturation et le sexe chez les mêmes individus ont modifié la compréhension actuelle du fonctionnement du système immunitaire chez les bivalves. Les saisons, le sexe et le stade de maturation ont un impact majeur sur l'utilisation des paramètres immunitaires pour l'évaluation environnementale en milieu marin. De récentes études (Bataille, mémoire de Master, 2005) sur des moules encagées en différents points de la Penfeld (Brest, France) ou sur des moules produites à différents points d'impact du panache des eaux de l'estuaire de la Vilaine (programme ANR-ECCODYN « Ripest ») intègrent déjà ces connaissances.

Néanmoins, d'un point de vue écophysiologique, l'étude de l'impact des facteurs saisonniers demeure délicate car il est difficile de découpler les variations des facteurs endogènes, comme la gamétogenèse, des variations des facteurs exogènes, comme la température ou la nourriture disponible. En effet, il s'agit bien d'étudier l'effet des variations des facteurs, et non pas l'intensité de ces facteurs. Chez les Salmonidés, par exemple, ce sont les changements – et leur signe – de photopériode qui reculent ou avancent la ponte (Bromage *et al.*, 1993; Bromage *et al.*, 2001). L'utilisation d'huîtres triploïdes permettait, ici, d'artificiellement bloquer l'impact de la reproduction sur les variations du système immunitaire. Malheureusement, lors de cette expérimentation, les individus triploïdes ont eu un cycle de reproduction comparable, mais avancé d'un mois, à celui des diploïdes. Par ailleurs, la stratégie envisagée pour suivre les paramètres environnementaux de la colonne d'eau à proximité de la moulière étudiée n'a pas encore pu être conduite à son terme. Les résultats bruts ne montrent a priori pas de corrélation entre les variations des paramètres immunitaires et les paramètres environnementaux. L'analyse statistique manque encore à cette première conclusion, mais trois voies d'interprétation seront à discuter : i) les données ne sont pas assez nombreuses pour permettre une telle analyse statistique ; ii) les paramètres

environnementaux suivis ne sont pas les plus déterminants ; iii) la mesure de ces paramètres n'est pas en adéquation avec leur impact sur la physiologie de l'individu. En effet, dans cette étude, les paramètres environnementaux ont été mesurés dans la colonne d'eau et non pas dans l'environnement immédiat (quelques millimètres) sous l'influence, par exemple, du courant inhalant ou exhalant de filtration de l'individu. Un schéma synthétise l'ensemble des ces impacts (figure 6.1)

L'impact des facteurs du cycle reproducteur sur la modulation du système immunitaire pouvait très bien être étudié avec des individus triploïdes. Pour les mêmes raisons que précédemment citées, cette stratégie n'a pas été complètement satisfaisante. Néanmoins, le suivi mensuel des paramètres immunitaires et de la gamétogenèse chez ces individus, a permis de confirmer la coïncidence de la chute de l'activité de phagocytose avec la période de ponte, sans pour autant qu'il y ait ponte la deuxième année. Paradoxalement, ce sont les individus en pleine maturation gonadique qui présentaient une immunopathologie plus forte. En suivant les variations saisonnières d'une espèce, *Mytilus edulis*, qui pondait deux fois dans l'année, l'impact de la période de ponte sur la chute de phagocytose aurait pu être confirmé. Les résultats préliminaires obtenus permettent de garder confiance en cette hypothèse. Par analogie à cette méthodologie, le suivi saisonnier des paramètres immunitaires, du sexe et du cycle reproducteur chez des bivalves vivants dans des régions où les facteurs environnementaux seraient drastiquement différents, permettrait de mieux comprendre l'impact de ces facteurs exogènes et endogènes sur le fonctionnement de leur système immunitaire.

Considérant la relation entre pattern hémocytaire et activité de phagocytose mise en évidence dans l'étude comparative des paramètres immunitaires des hémocytes prélevés sur deux sites différents, les variations saisonnières observées pourraient être aussi le fait de changement dans le schéma de distribution des sous populations hémocytaires dans l'hémolymphe. L'étude des sous populations hémocytaires a souvent fait appel à des anticorps monoclonaux chez *Ostrea edulis* (Xue *et al.*, 2001), *Mytilus edulis* (Noël *et al.*, 1994; Dyrinda *et al.*, 1997), ou encore chez *Chlamys farreri* (Jing et Wenbin, 2005). Néanmoins, l'utilisation des anticorps dirigés contre les hémocytes d'une espèce sur les hémocytes de plusieurs espèces de bivalves, montre de nombreuses réactions croisées, limitant ainsi la pertinence de leur utilisation (Jing et Wenbin, 2006). D'autres études utilisent



des lectines (Pipe *et al.*, 1997) ou des sondes spécifiques des mitochondries afin d'analyser par cytométrie de flux les différentes sous populations d'hémocytes de bivalves (Tu *et al.*, 2007). Cette discrimination permettrait de répondre à des questions plus fondamentales sur la régulation des patterns hématocytaires, et par là même, l'hématopoïèse chez les bivalves. Le suivi des variations temporelles des patterns hématocytaires, en marquant ainsi les hémocytes, permettrait de vérifier cette régulation, voire de localiser les tissus hématopoïétiques chez d'autres bivalves que *Chlamys farreri* (Xing et Zahn, 2005). L'impact des polluants sur le système immunitaire des bivalves pourrait être mieux compris, en même temps que de progresser sur la connaissance des mécanismes de régulation du pattern hématocytaire, en étudiant les changements de ces patterns en réponse à des expositions à des polluants, comme le cuivre chez *Mytilus edulis* (Pipe *et al.*, 1999).

Toutefois, ces études posent la question de la régulation du changement fonctionnel des hémocytes ou de ce schéma de distribution. Ce changement saisonnier doit répondre nécessairement à un message. Ce message à travers tout l'organisme ferait intervenir une hormone et un récepteur exprimé chez les hémocytes. Actuellement, parce qu'il est présent dans les gonades de moules tout au long de l'année à des taux différents (Zhu *et al.*, 2003), qu'il intervient dans la gamétogenèse de *Mya arenaria* (Siah *et al.*, 2003; Gauthier-Clerc *et al.*, 2006a), qu'il induit des changements immunitaires importants à des doses physiologiquement significatives chez la moule et chez la mye (Canesi *et al.*, 2004a; Canesi *et al.*, 2006; Gauthier-Clerc *et al.*, 2006b; Canesi *et al.*, 2007) et que, enfin, les hémocytes expriment des récepteurs à cette hormone (Canesi *et al.*, 2004a), le candidat messager est l'E2. Le système nerveux et le système immunitaire, tous deux assumant des fonctions analogues vis-à-vis de leur environnement, partagent certains mécanismes cellulaires ou moléculaires comme les cytokines (Bayne, 2003; Ottaviani, 2006). L'axe physiologique de transmission de ce message pourrait faire intervenir la triade neuro-immuno-endocrine déjà responsable des effets neurotoxiques et immunotoxiques des métaux lourds chez la moule (Nieto-Fernandez *et al.*, 2000). L'étude de cette triade chez les bivalves sert également de modèle d'étude de la fonction neuro-immuno-endocrine, encore mal connue, chez les mammifères (Ottaviani, 2004). Les expositions « in tubo » de moules à l'E2, ont démontré que les effets immunotoxiques de l'E2 sur la capacité phagocytaire des hémocytes dépendaient du sexe et de la saison. Notamment, les mâles étaient plus sensibles à ces effets de l'E2 en octobre, alors que cette hormone ne semblait n'avoir plus aucun effet sur les

hémocytes des moules des deux sexes exposées en juin. Un suivi saisonnier de l'expression des récepteurs œstrogéniques dans les hémocytes permettrait de vérifier la relation entre variations saisonnières d'activité de phagocytose et cycle reproducteur. Toutefois, la ponte chez un bivalve d'eau douce, est régulée par la dopamine ou la sérotonine (Gagne *et al.*, 2004) dont les effets immunotoxiques ne sont pas encore connus.

En résumé, cette étude montre l'impact de facteurs endogènes et exogènes sur les paramètres immunitaires des hémocytes. Mais d'autres facteurs pourraient également intervenir, comme les signaux environnementaux cycliques comme les marées pourraient moduler ces paramètres. Dans toutes les expérimentations en laboratoire ou sur le terrain menées dans cette étude, les animaux ont été collectés dans les mêmes conditions d'heure marée, de transport et de conditionnement. D'autres facteurs endogènes peuvent également moduler ces paramètres immunitaires, comme le facteur génétique suggéré par Ford et Paillard (2007). La diversité de ces facteurs confondants potentiels est à mettre en relation avec la diversité des fonctions assumées par les hémocytes. Il est alors prudent de revenir sur le terme de « paramètre immunitaire » des hémocytes. Par exemple, la phagocytose, paramètre immunitaire largement reconnu en immunologie, est le processus cellulaire atavique de la nutrition et du transport de nutriments, fonction également assumée par les hémocytes (Fisher, 1986 ; Bachère, 2004). En conséquence, l'ensemble des paramètres mesurés rend compte de la fonction immunitaire chez les bivalves, mais leur modulation peut rendre compte de processus physiologiques indépendants de cette fonction de défense.

### **III. Des impacts des xénobiotiques des activités anthropiques**

De nombreuses substances chimiques issues des activités humaines ont démontré leurs effets délétères sur le système immunitaire d'animaux sentinelles de la qualité de l'environnement (Galloway et Depledge, 2001; Auffret, 2005; Duffy et Zelikoff, 2005; Goven *et al.*, 2005; Rollins-Smith et Smits, 2005). Ici, l'évaluation immunotoxique de polluants à des doses environnementales renforce la pertinence de l'analyse du risque chimique encouru dans l'environnement. Les réponses immunitaires mesurées suggèrent une forte interrogation quant à l'efficacité des réglementations en cours.

D'autre part, l'approche de l'impact chimique des activités humaines par une substance chimique représentative, permet une vision pragmatique des risques chimiques associés à cette activité. Ainsi, cette étude peut servir à l'évaluation du risque chimique d'une activité humaine en fonction de son intensité ou de son rythme d'activité. Comme dans le cas de l'augmentation récente des concentrations du diuron dans les marinas (Chesworth *et al.*, 2004), cette approche peut aussi être utilisée pour prédire des effets consécutifs à une augmentation potentielle de l'occurrence du polluant, due à une intensification de son utilisation ou à une intensification de l'activité. De même, l'étude toxicologique de mélanges modélisant les impacts chimiques de sites d'activités humaines est une approche, une approximation, du risque chimique de ces sites. Dans ce cas, l'absence de différences immunotoxiques chez les individus contaminés par rapport aux individus témoins ne signifie en rien de l'absence d'effet au niveau de l'organisme. Au contraire ils révèlent des interactions complexes entre les substances chimiques choisies qui pourraient être mis en évidence par des études de mélanges de substances en proportion différente.

Mais cette étude, outre les variations saisonnières naturelles du système immunitaire, a montré surtout que le système immunitaire des bivalves n'est pas également sensible aux xénobiotiques tout au long de l'année. Sans avoir pu les découpler, le cycle reproducteur semble plus prépondérant dans cette différence de sensibilité que les paramètres environnementaux. Ce résultat signifie que i) l'évaluation toxicologique d'une substance chimique, doit se faire à des saisons différentes, principalement motivées par des moments clefs du cycle reproducteur ii) l'étude des effets d'une substance chimique reste critique dans l'évaluation du risque environnemental. Un schéma synthétise l'ensemble de ces impacts (figure 6.1). L'étude mensuelle des effets immunotoxiques d'une substance toxique de référence, bien que certainement très instructive sur ses mécanismes immunotoxiques, ne permettrait pas de conclure sur les réponses immunotoxiques d'autres xénobiotiques selon les saisons.

#### **IV. Recommandations pour l'évaluation du risque environnemental utilisant les outils immunotoxicologiques**

À l'issu de ces travaux, on peut émettre une série de recommandations i) pour l'évaluation du risque environnemental de substances chimiques et ii) pour le suivi environnemental de la qualité d'écosystèmes marins côtiers.

La majeure partie de cette étude s'est focalisée sur quatre paramètres immunitaires chez les bivalves : la cellularité, la mortalité hémocytaire, l'index phagocytaire et la capacité phagocytaire, ces paramètres étant considérés comme les outils, *a minima*, pour évaluer le système immunitaire. Nombre d'études physiologiques chez les bivalves utilisent, parmi l'ensemble des biomarqueurs des fonctions physiologiques, un seul paramètre du compartiment « fonction immunitaire », souvent l'activité de phagocytose. Cette démarche, à la lumière des travaux présentés ici, apparaît critiquable. En effet, toutes les études immunotoxicologiques mettent en évidence le besoin de considérer plusieurs paramètres immunitaires pour évaluer la perturbation de l'ensemble de la fonction (Auffret, 2005). De même, l'utilisation d'un biomarqueur unique comme la stabilité lysosomale est critiquable quand elle est appliquée chez les hémocytes. Certes, ce test de toxicité cellulaire est corrélé à la santé de l'animal (Allen et Moore, 2004), mais il a été d'abord mis au point et étudié sur les cellules de la glande digestive et n'est donc pas relié à la fonction de défense. Enfin, même appliquée sur les hémocytes ce test ne rend compte de perturbations cellulaires qu'une fois que les agents étrangers ont été internalisés par la fonction de phagocytose. C'est pourquoi il faut distinguer les paramètres immunitaires validés pour ce diagnostic environnemental, des autres paramètres immunitaires utilisés pour l'analyse du fonctionnement du système immunitaire ou des mécanismes immunotoxiques. Une panoplie d'outils du système immunitaire des bivalves, analogue aux « tier I » et « tier II » établis par Luster *et al.* (1992; 1993), est proposée ci-après (Tableau 11). Dans le cadre d'études environnementales harmonisées ou d'évaluation standardisée du risque immunotoxicologique en milieu aquatique, cette panoplie devra faire l'objet d'intercalibration et de standardisation de protocoles, l'instar des protocoles figurant dans les guides d'études immunotoxicologiques appliqués aux vertébrés (Germolec, 2004).

Tableau 12 : Panoplie d'outils proposés à utiliser selon l'objectif visé

<i>Paramètres immunitaires</i>	<i>Contexte d'utilisation</i>
Batterie 1 : <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cellularité (cell.mL<sup>-1</sup>)</li> <li>▪ Mortalité hémoducytaire</li> <li>▪ L'activité de phagocytose</li> <li>▪ La capacité phagocyttaire des hémoducytes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Suivi environnemental harmonisé</li> <li>▪ Évaluation du risque immunotoxique harmonisée</li> </ul>
Batterie 2 : <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Stabilité lysosomale</li> <li>▪ Espèces oxygénées réactives</li> <li>▪ Estérases</li> <li>▪ Mitochondries hémoducytaires</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Étude spécifique sur le fonctionnement du système immunitaire</li> <li>▪ Étude des mécanismes des effets immunotoxiques de substances chimiques</li> </ul>

La présente étude recommande fortement de tenir compte également de sexe et des stades de gamétogenèse des individus échantillonnés, facteurs étant apparus comme pouvant confondre massivement la réponse immunitaire et modifier la sensibilité aux polluants. De plus, même si l'impact réel des facteurs physiques, chimiques et biologiques de la colonne d'eau n'a pu être découplé de l'impact du cycle reproducteur, la mesure des paramètres environnementaux classiques (température, salinité, chlorophylle a, etc.) doit toujours être effectuée, dans le cadre de suivi environnemental, afin de comprendre l'origine d'éventuelles anomalies. L'approche méthodologique, écophysiologique et écotoxicologique de cette étude donnent des éléments concrets pour entrer dans une phase d'harmonisation, telle que voulue par le Réseau Atlantique Bivalve. Les travaux menés, ici, sur les outils immunotoxicologiques, s'inscrivent alors dans le cadre d'une harmonisation, à l'échelle globale, des suivis environnementaux et des évaluations du risque chimique et de la création d'un groupe international sur la pollution chimique (IPCP), pour répondre de manière globale et harmonisées aux perturbations anthropiques, notamment en milieux marin côtiers et estuariens (Scheringer *et al.*, 2006; Scheringer, 2007).

A l'instar d'études immunotoxicologiques chez les vertébrés (Burchiel *et al.*, 1997), cette étude suggère l'utilisation de la cytométrie en flux pour l'analyse multiparamétrique des cellules de la défense immunitaire et comme outil d'harmonisation. L'encombrement des cytomètres était le principal obstacle aux études de terrain mais, les récentes innovations technologiques ont vu l'apparition sur le marché d'appareils performants plus compacts et de plus en plus conviviaux. Ces nouveaux appareils autorisent l'utilisation de la cytométrie en flux lors d'évaluation environnementale sur des sites de niveau d'infrastructure faible.

Que ce soit dans un objectif d'harmonisation ou de standardisation des méthodes et des outils, il est nécessaire que des études, appliquées à l'évaluation environnementale en milieu marin côtier ou estuarien, se focalisent sur un référent. Cette référence peut être géographique (un site), biologique (un modèle biologique ou une population donnée), toxique (un polluant, comme le chlorure de mercure) ou temporel (une date donnée). L'observation d'une population d'un site précis permet d'accumuler les données environnementales et biologiques sur une échelle de temps. Alors, l'encagement d'individus de cette population sur différents sites d'intérêt, permet alors d'évaluer le risque chimique à partir d'une base conséquente d'informations. Dans ces conditions, le site de référence devient alors un site

atelier, offrant la possibilité de répondre aux exigences réglementaires, comme celle de la directive-cadre sur l'eau européenne et à sa définition d'un « bon état écologique ».

Néanmoins, l'étude du risque chimique d'une molécule nécessite de disposer également d'une base conséquente de données sur le comportement d'un unique modèle biologique sur lequel il est possible de procéder aux études écotoxicologiques. Actuellement, la seule possibilité d'obtenir un modèle biologique avec une variabilité réduite est de disposer d'individus issus de l'élevage. La filière conchylicole pourrait trouver ici un intérêt en s'associant aux organismes de surveillance de la qualité du milieu, comme dans le cas des réseaux mis en place par l'IFREMER. Des études *in vitro* sont aussi nécessaires pour évaluer l'immunotoxicité d'un produit. Dans ce cadre, en l'absence de lignée cellulaire d'hémocytes chez les bivalves une référence cellulaire en milieu marin côtier, reconnue par tous, manque. Mais, de récents développements dans la conservation d'hémocytes de moules sur plusieurs semaines (Cao *et al.*, 2003), ou dans des bivalves artificiels pourraient offrir des modèles alternatifs d'évaluation du comportement chimique de polluant dans les prochaines années (Vrana *et al.*, ; Booij *et al.*, 2006).

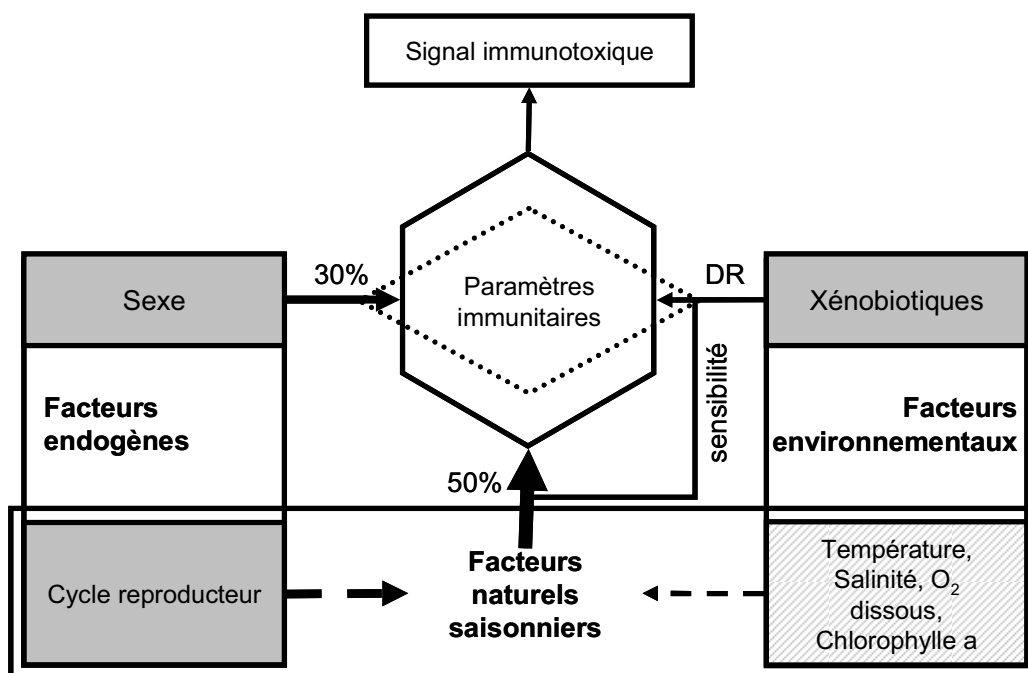


Figure 6.1 : Synthèse de l'impact des facteurs confondants sur le signal immunotoxique. Les xénobiotiques produisent ce signal immunotoxique en perturbant les paramètres immunitaires selon la dose (DR). Mais, des facteurs endogènes peuvent également moduler la réponse immunitaire. Parmi ces facteurs, le sexe peut induire des variations de l'ordre de 30%. Certains de ces facteurs endogènes, comme le cycle reproducteur, varient au cours des saisons, conjointement avec les facteurs environnementaux naturels et peuvent induire des différences de réponse à hauteur de 50%. Néanmoins, c'est le cycle reproducteur, notamment le moment de la ponte et la gamétogenèse, qui jouerait un rôle majeur dans ces variations, par rapport aux paramètres environnementaux mesurés dans cette étude. Enfin, les xénobiotiques induisent un signal immunotoxique variant selon la dose (DR). De plus, les facteurs saisonniers et endogènes peuvent modifier la sensibilité aux effets immunotoxiques des xénobiotiques.





*Chapitre 7.*

*Conclusion générale et*

*perspectives*

---



## I. Conclusions de l'étude

Cette étude a mis en évidence, à l'aide d'un développement méthodologique, d'une approche écophysiologique et d'une application opérationnelle écotoxicologique, l'importance des facteurs sexe et cycle reproducteur pour bien utiliser les outils immunotoxicologiques pour comprendre les effets biologiques des contaminants présents dans le milieu marin. Sur le plan scientifique, cette étude a montré l'impact majeur de facteurs endogènes sur les paramètres immunitaires des bivalves, soulignant le caractère plurifonctionnel des hémocytes. Sur le plan opérationnel, cette étude a permis de progresser dans la validation des biomarqueurs pertinents pour le risque toxique et une méthodologie adaptée.

Ces travaux ont d'abord mis en évidence l'importance critique du site anatomique de prélèvement des hémocytes pour des études immunotoxicologiques. À la suite d'ateliers internationaux d'harmonisation de méthodes d'analyses des paramètres immunitaires, un ensemble de protocoles, à standardiser, a été proposé afin de pouvoir mener des études multipartenaires et multisites, par exemple dans le cadre de suivi de sites ateliers d'un réseau de recherche transatlantique en écotoxicologie (Réseau Atlantique Bivalve). Un indice cumulé immunotoxicologique a été développé, offrant une vision globale de la réponse immunotoxique. Enfin, cet axe a permis la mise au point d'un nouveau protocole opérationnel d'exposition individuelle offrant plusieurs avantages. Il est adapté à l'évaluation du risque chimique en milieu marin puisque mis au point pour l'exposition de *Mytilus edulis*. Sa mise en œuvre permet de standardiser les conditions d'exposition, d'ajouter la mesure d'un trait de vie de suivi expérimental tout en réduisant le risque chimique pour l'utilisateur. Dans le deuxième axe écophysiologique, chez *Crassostrea gigas*, comme chez *Mytilus edulis*, les paramètres immunitaires ont montré des variations saisonnières calées sur le cycle reproducteur et pouvant évoluer du simple au double. Néanmoins, le suivi des paramètres de la colonne d'eau n'a pu permettre de déconvoluer l'impact de ces derniers sur ces variations par rapport à la gamétogenèse. Grâce à l'observation histologique des gonades, le sexe est apparu comme un facteur confondant significatif pouvant induire des différences d'immunocompétence de 20%-30% entre les mâles et les femelles. Enfin, le dernier axe a montré que le signal immunotoxique de polluants pouvait être brouillé en ne discriminant pas

les individus testés selon leur sexe. De même, la sensibilité immunotoxique aux polluants pouvait changer radicalement, selon le cycle reproducteur et les autres facteurs saisonniers. L'importance de ces facteurs confondants dans l'évaluation environnementale d'activités anthropiques croissantes ou rythmiques a été mise en évidence avec des doses de polluants actuellement mesurés dans l'environnement, seuls ou en mélanges.

En ne tenant pas compte de ces facteurs, l'utilisation des outils immunotoxicologiques pour le risque environnemental en milieu marin peut aboutir à sous-évaluer le signal du système immunitaire. A l'inverse, l'utilisation de ces outils pour l'évaluation du risque immunotoxique de substances chimiques sans considération pour ces facteurs, peut conduire à ignorer des effets toxiques. Le sexe est un facteur pouvant être responsable jusqu'à 20% du de la réponse immunitaire alors que la sensibilité aux toxiques peut être différente selon le sexe. Le facteur saison peut lui aussi perturber le signal immunotoxique en évoluant du simple au double en conditions naturelles et pouvant masquer des effets immunotoxiques. Par contre, cette étude n'a pu mettre en évidence clairement l'importance de la gamétogenèse par rapport aux paramètres physiques, chimiques et biologiques de la colonne d'eau. Dans ce contexte d'analyse du risque chimique des activités anthropiques en milieu marin côtier, cette étude a validé plusieurs critères pour l'utilisation des outils immunotoxicologiques pour l'évaluation du risque chimique en milieu marin selon les normes de validation des biomarqueurs de l'Organisation Mondiale de la Santé (tableau 1 et 2 Cf. chapitre 1).

La présente étude a étayé les connaissances sur le comportement de ces biomarqueurs hors contexte de contamination chez deux espèces de bivalves. De même l'estimation de leur variabilité inter et intra individuelles s'est améliorée avec le protocole d'exposition « in tubo » et avec les travaux d'intercalibration soulignant le fort caractère intrinsèque de cette variabilité. Développés chez plusieurs espèces de bivalves, les paramètres immunitaires ont déjà montré toutes les caractéristiques premières des biomarqueurs d'effet, comme leur capacité à discriminer des populations statistiques avec des niveaux d'exposition différents ou, l'existence de courbes doses-réponses pour de nombreux polluants (Auffret, 2005). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la validation de biomarqueurs nécessite aussi l'étude critique de la faisabilité de l'utilisation de ces biomarqueurs. L'expérience tirée des nombreuses études de suivis ou d'évaluation du risque chimique de xénobiotiques a été plusieurs fois échangée par les équipes participantes lors des différents ateliers. Les

conclusions montrent la faisabilité de telles études dans des conditions opératoires qui peuvent maintenant entrer dans des phases opérationnelles de standardisation, toutefois, en tenant en compte des recommandations issues de ce travail.

## **II. Perspectives de l'étude**

L'originalité de ces travaux réside dans l'étude des facteurs endogènes qui modifient les paramètres immunitaires. Néanmoins, les autres études menées présentent des perspectives sociétales et de recherche intéressantes.

Ces travaux présentent un modèle d'exposition adapté à l'évaluation du risque chimique en milieu marin (utilisation d'organismes sentinelles du milieu marin, durée d'exposition courte, révélant des effets toxiques, même à de faibles doses environnementales). Le protocole *in tubo* pourraient être utilisée pour l'évaluation des effets toxiques des perturbateurs endocriniens, des biocides, des produits phytosanitaires, de produits pharmaceutiques, etc., en application de nouvelles réglementations sur les substances dangereuses. L'application à des polluants types de certaines activités humaines et du mercure à des doses chroniques environnementales, ainsi que l'impact de facteurs confondants, a permis de prendre conscience de la sévérité des conséquences de la présence de ces polluants dans le milieu marin. Les résultats obtenus trouvent écho dans les nouvelles réglementations sur les substances chimiques (REACH, TGD) ou sur la protection de l'environnement marin (directive-cadre eau de la commission européenne, stratégie maritime européenne, travaux des commissions OSPAR, Barcelone et d'Helsinki). Cette interaction entre recherche et législation est appelé encore à croître, tellement les objectifs de protection de l'environnement et de santé publique sont liés. D'ailleurs, Health & environment alliance (HEAL), Health care without harm (HCWH), en partenariat avec le Centre national de l'information indépendante sur les déchets (CNIID), trois organisations non gouvernementales, veulent imposer une interdiction mondiale d'utilisation du mercure au prochain conseil d'administration du Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) qui s'est déroulée à Nairobi du 5 au 9 février 2007 (SEGHIER, 2007).

Initiés en 2003, la présente étude ouvre des perspectives pour l'étude des facteurs

abiotiques et biotiques pouvant moduler la réponse immunitaire chez les bivalves. Les efforts de recherche quant à l'utilisation de ces outils doivent être de deux natures différentes. Premièrement, il est nécessaire d'entreprendre, surtout dans le cadre d'études multisites et multipartenaires, des études sur le conditionnement du matériel biologique avant analyse. Le transport des animaux, les conditions d'acclimatation, ou l'impact des variations saisonnières de température et de salinité sur les méthodes d'analyse des paramètres hématocytaires doivent faire l'objet de champs d'investigations renseignés. Deuxièmement, des problématiques écophysiologiques doivent être étudiées comme l'impact des patterns hématocytaires sur les paramètres immunitaires et leur variation saisonnière. Encore, le découplage de l'impact des facteurs saisonniers, endogènes, comme le cycle reproducteur, ou exogènes, ne pourra s'étudier que sur des espèces de bivalves dont le cycle de reproduction est différent, ou des espèces identiques à large répartition spatiale, vivant dans des écosystèmes différents.

Par ailleurs d'autres facteurs que ceux étudiés dans cette étude peuvent moduler potentiellement la réponse immunitaire. Des approches génétiques permettraient de progresser sur cette variabilité individuelle importante chez les bivalves en suivant l'expression de gènes. D'autre part, l'impact de la ressource trophique, en qualité et en quantité, offre une perspective intéressante de recherches à mener. En effet, des études sur l'interaction entre phytoplancton et particules en suspension, source énergétique de ces animaux suspensivores pourrait permettre de comprendre l'impact de blooms d'algues toxiques, des variations saisonnières de nourriture, mais aussi de la biodisponibilité des polluants sur les paramètres immunitaires chez les bivalves. L'approche à différentes échelles expérimentales, *in tubo*, en aquariums ou en mésocosmes est suggérée. Ce dernier dispositif expérimental permet, en effet, le contrôle d'un ensemble de paramètres environnementaux de la colonne d'eau (température, salinité, nourriture, etc.) et de reproduire des événements météorologiques ou anthropiques qui remettent en suspension les sédiments chargés en polluants. Cette échelle adaptée aux études chroniques autoriserait l'étude de ces impacts de ces facteurs sur les outils immunotoxicologiques mais plus largement de comprendre les effets de ces facteurs sur le fonctionnement du système immunitaire.

L'utilisation d'enceintes benthiques ouvre également de nouvelles perspectives. En effet, l'analyse de la diffusion des contaminants chimiques à l'interface eau-sédiment (Monperrus *et al.*, 2005), la mesure de paramètres physico-chimiques de l'environnement

immédiat de bivalves sous influence de leur physiologie et la mesure de paramètres physiologiques globaux, en regard des paramètres immunitaires, permettraient d'investiguer au plus près de la réalité de l'environnement des bivalves.

D'autre part, l'approche écophysologique de cette étude, mettant en exergue des variations saisonnières dans les fonctions hémycytaires ouvre de nouveaux champs exploratoires de la physiologie des bivalves. En effet les résultats obtenus permettent d'étudier les autres fonctions hémycytaires, notamment celles liées à la croissance ou la réparation coquillière qui restent très mal connues. Une étude adéquate permettrait de comprendre, le rôle des hémycytes dans les variations de la croissance des valves, proxy utilisé en paléocénographie pour retracer les changements de température.

Enfin, les interactions entre la fonction immunitaire et la fonction de reproduction ainsi que des différences entre les sexes, mis en évidence dans ces travaux, peuvent ouvrir une perspective de recherche originale en abordant la problématique de l'effet de l'oestradiol sur la réponse immunitaire. Il serait important de connaître les effets saisonniers *in vitro* de l'E2 sur l'activité de phagocytose des hémycytes. L'étude de l'expression des récepteurs oestrogéniques et le dosage hémylymphatique de l'oestradiol au cours des saisons inviterait à étudier de plus près la fonction neuro-immuno-endocrine. Les hémycytes étant les seules cellules circulantes chez les bivalves, ces espèces fournissent des modèles biologiques très intéressants pour l'étude comparée de cette fonction intégratrice. Il faudrait aussi connaître les variations individuelles à court (jour) et à moyen terme (semaines) chez un même individu puis étudier l'effet d'hormones ou de cytokines sur ces variations, étudiant de plus près la fonction neuro-immuno-endocrine voire la convergence fonctionnelle entre le système immunitaire et le système nerveux (Bayne, 2003; Ottaviani, 2004, 2006).

En résumé des perspectives ouvertes par ces résultats, l'importance d'une approche pluridisciplinaire et multisite a été mise en avant plusieurs fois. C'est cette approche, focalisée sur les bivalves, que propose d'appliquer le Réseau Atlantique Bivalve, regroupant des compétences diverses en écotoxicologie et se focalisant sur des sites ateliers de part et d'autre de l'Atlantique.





# *Bibliographie*

---



- Aarab, N., Lemaire-Gony, S., Unruh, E., Hansen, P.D., Larsen, B.K., Andersen, O.K. et Narbonne, J.F., 2006. Preliminary study of responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether. *Aquatic toxicology*. 78, S86-S92.
- Adamo, S.A., 2004. How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Animal Behaviour*. 68, 1443-1449.
- Allam, B., Ashton-Alcox, K.A. et Ford, S.E., 2001. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Dev Comp Immunol*. 25, 365-75.
- Allen, J.I. et Moore, M.N., 2004. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? *Marine Environmental Research*. 58, 227-232.
- Allen, S.K. et Downing, S.L., 1990. Performance of triploid pacific oysters, *Crassostrea gigas*: gametogenesis. *Canadian Journal of Aquatic Sciences*. 47, 1213-1222.
- Alzieu, C., 2000. Environmental impact of TBT: the French experience. *The Science of The Total Environment*. 258, 99-102.
- Alzieu, C., Thibaud, Y., Heral, M. et Boutier, B., 1980. Évaluation des risques dus à l'emploi des peintures antisalissures dans les zones conchyliques. *Rev. Trav. Inst STPM*. 44, 301-348.
- Auffret, M., 1988. Bivalve Hemocyte Morphology. In: *Disease processes in marine bivalve molluscs*, W. S. Fisher. Washington, American Society special publication. 18: 169-177.
- Auffret, M., 2005. Bivalves as models for marine immunotoxicology. In: *Investigative immunotoxicology, models & approaches in Immunotoxicology*, H. Tryphonas, M. Fournier, B.R. Blakley, J. E. G. Smits et P. Brousseau, CRC Press: 29-48.
- Auffret, M., Duchemin, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D. et Marhic, A., 2004. Monitoring of immunotoxic responses in oysters reared in areas contaminated by the "Erika" oil spill. *Aquatic Living Resources*. 17, 297-302.
- Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C. et Moraga, D., 2002. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Mar Environ Res*. 54, 585-9.
- Auffret, M. et Oubella, R., 1994. Cytometric parameters of bivalve molluscs. In: *Modulators*

- of fish immune responses. Fair Haven, USA, SOS Publications. 1: 23-32.
- Auffret, M. et Oubella, R., 1995. Cytological and cytometric analysis of bivalve mollusc hemocytes. In: Techniques in fish immunology, J. S. Stolen, T. C. Fletcher, S. A. Smith *et al.* Fair Haven, NJ, USA, SOS publications. 4: 55-64.
- Auffret, M. et Oubella, R., 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. 118, 705-712.
- Auffret, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Baron, J., Moraga, D. et Duchemin, M., 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. Ecotoxicology and Environmental Safety. 63, 393-405.
- Bachere, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J. et Romestand, B., 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunol Rev. 198, 149-68.
- Ballarin, L., Pampanin, D.M. et Marin, M.G., 2003. Mechanical disturbance affects haemocyte functionality in the Venus clam *Chamelea gallina*. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology. 136, 631-640.
- Barcia, R., Arbeteta, J. et Ramos-Martinez, J.I., 1999. The IL-2 receptor in hemocytes of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Life. 48, 419-423.
- Bayne, C.J., 2003. Origins and Evolutionary Relationships Between the Innate and Adaptive Arms of Immune Systems. Integr. Comp. Biol. 43, 293-299.
- Becker, C.K., Parker, J.W. et Hechinger, M.K., 2001. Is forward scatter monotonic on commercial flow cytometers ?
- Beliaeff, B. et Burgeot, T., 2002. INTEGRATED BIOMARKER RESPONSE: A USEFUL TOOL FOR ECOLOGICAL RISK ASSESSMENT. Environmental Toxicology and Chemistry. 21, 1316-1322.
- Bernier, J., Brousseau, P., Krzystyniak, K., Tryphonas, H. et Fournier, M., 1995a. Immunotoxicity of heavy metals in relation to Great Lakes. Environ Health Perspect. 103 Suppl 9, 23-34.
- Bernier, J., Girard, D., Krzystyniak, K., Chevalier, G., Trottier, B., Nadeau, D., Rola-Pleszczynski, M. et Fournier, M., 1995b. Immunotoxicity of aminocarb. III. Exposure route-dependent immunomodulation by aminocarb in mice. Toxicology. 99, 135-46.

- Bernier, J., Hugo, P., Krzystyniak, K. et Fournier, M., 1987. Suppression of humoral immunity in inbred mice by dieldrin. *Toxicol Lett.* 35, 231-40.
- Biomarkers Definitions Working Group, 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 69, 89-95.
- Blackmore, G. et Wang, W.X., 2003. Comparison of metal accumulation in mussels at different local and global scales. *Environ Toxicol Chem.* 22, 388-95.
- Blain, S., Guillou, J., Treguer, P., Woerther, P., Delauney, L., Follenfant, E., Gontier, O., Hamon, M., Leilde, B., Masson, A., Tartu, C. et Vuillemin, R., 2004. High frequency monitoring of the coastal marine environment using the MAREL buoy. *Journal of Environmental Monitoring.* 6, 569-575.
- Blakley, B.R., Yole, M.J., Brousseau, P., Boermans, H. et Fournier, M., 1998a. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, trifluralin and triallate herbicides on immune function. *Vet Hum Toxicol.* 40, 5-10.
- Blakley, B.R., Yole, M.J., Brousseau, P., Boermans, H. et Fournier, M., 1998b. Effect of pentachlorophenol on immune function. *Toxicology.* 125, 141-8.
- Blakley, B.R., Yole, M.J., Brousseau, P., Boermans, H. et Fournier, M., 1999. Effect of chlorpyrifos on immune function in rats. *Vet Hum Toxicol.* 41, 140-4.
- Booij, K., Smedes, F., van Weerlee, E.M. et Honkoop, P.J., 2006. Environmental monitoring of hydrophobic organic contaminants: the case of mussels versus semipermeable membrane devices. *Environ Sci Technol.* 40, 3893-900.
- Booth, S. et Zeller, D., 2005. Mercury, food webs, and marine mammals: implications of diet and climate change for human health. *Environ Health Perspect.* 113, 521-6.
- Bouchard, N., Pelletier, E. et Fournier, M., 1999. Effects of butyltin compounds on phagocytic activity of hemocytes from three marine bivalves. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 18, 519-522.
- Boudou, A. et Ribeyre, F., 1997. Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environ Health Perspect.* 105 Suppl 1, 21-35.
- Bouman, H.A., Ulloa, O., Scanlan, D.J., Zwirgmaier, K., Li, W.K., Platt, T., Stuart, V., Barlow, R., Leth, O., Clementson, L., Lutz, V., Fukasawa, M., Watanabe, S. et Sathyendranath, S., 2006. Oceanographic basis of the global surface distribution of *Prochlorococcus* ecotypes. *Science.* 312, 918-21.
- Bowen, R.E. et Depledge, M.H., 2006. Rapid assessment of marine pollution (RAMP).

- Marine Pollution Bulletin. 53, 631-639.
- Brake, J., Davidson, J. et Davis, J., 2004. Field observations on growth, gametogenesis, and sex ratio of triploid and diploid *Mytilus edulis*. Aquaculture. 236, 179-191.
- Broeg, K. et Lehtonen, K.K., 2006. Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: Integrated assessment of a multi-biomarker approach. Marine Pollution Bulletin. 53, 508-522.
- Bromage, N., Porter, M. et Randall, C., 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. Aquaculture. 197, 63-98.
- Bromage, N., Randall, C., Davies, B. et Thrush, M., 1993. Photoperiodism and the control of reproduction and development in farmed fish. In: Aquaculture: Fundamental and Applied Research, B. Lahlou et P. Vitiello. Washington, DC., American Geophysical Union. 43: 81-102.
- Brousseau, P., Beaudet, M., Payette, Y., Blakely, B.R. et Fournier, M., 1998. Manual of Immunological Methods. CRC press.
- Brousseau, P., Blakley, B., Boermans, H. et Fournier, M., 2005. Approaches to immunotoxicity testing: the need for national and international harmonization/standardization of immunotoxicity methods. In: Investigative immunotoxicology, models & approaches in Immunotoxicology, H. Tryphonas, M. Fournier, B.R. Blakley, J. E. G. Smits et P. Brousseau, CRC Press: 421-430.
- Brousseau, P., Dunier, M., Deschaux, P., De Guise, S., Krzystiniak, K. et Fournier, M., 1997. Marqueurs immunologiques. In: Biomarqueurs en écotoxicologie - aspects fondamentaux, L. Lagadic, T. Caquet, J. C. Amiard et F. Ramade. Paris, Masson: 287-314.
- Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H. et Fournier, M., 2000. Flow cytometric as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. Toxicology. 142, 145-156.
- Brown, R.J., Galloway, T.S., Lowe, D., Browne, M.A., Dissanayake, A., Jones, M.B. et Depledge, M.H., 2004. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. Aquat Toxicol. 66, 267-78.
- Burchiel, S.W., Kerkvliet, N.L., Gerberick, G.F., Lawrence, D.A. et Ladics, G.S., 1997. Assessment of Immunotoxicity by Multiparameter Flow Cytometry,. Fundamental and

- Applied Toxicology. 38, 38-54.
- Cajaraville, M.P., Olabarrieta, I. et Marigomez, I., 1996a. In vitro activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: a case study in the Abra estuary (Biscay bay). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 35, 253-260.
- Cajaraville, M.P., Olabarrieta, I. et Marigomez, I., 1996b. In Vitro Activities in Mussel Hemocytes as Biomarkers of Environmental Quality: A Case Study in the Abra Estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 35, 253-260.
- Campbell, L.M., Norstrom, R.J., Hobson, K.A., Muir, D.C., Backus, S. et Fisk, A.T., 2005. Mercury and other trace elements in a pelagic Arctic marine food web (Northwater Polynya, Baffin Bay). *Sci Total Environ*. 351-352, 247-63.
- Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Lorusso, L.C., Marchi, B., Burattini, S., Falcieri, E. et Gallo, G., 2004a. Rapid effects of 17[beta]-estradiol on cell signaling and function of *Mytilus* hemocytes. *General and Comparative Endocrinology*. 136, 58-71.
- Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Scarpato, A., Citterio, B., Pruzzo, C. et Gallo, G., 2003. Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinase-mediated cell signaling. *Aquatic toxicology*. 63, 293-306.
- Canesi, L., Ciacci, C., Lorusso, L.C., Betti, M., Guarnieri, T., Tavolari, S. et Gallo, G., 2006. Immunomodulation by 17beta-estradiol in bivalve hemocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 291, R664-73.
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M. et Pruzzo, C., 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc Res Tech*. 57, 469-76.
- Canesi, L., Lorusso, L.C., Ciacci, C., Betti, M., Rocchi, M., Pojana, G. et Marcomini, A., 2007. Immunomodulation of *Mytilus* hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens: In vitro and in vivo studies. *Aquatic toxicology*. 81, 36-44.
- Canesi, L., Lorusso, L.C., Ciacci, C., Betti, M., Zampini, M. et Gallo, G., 2004b. Environmental estrogens can affect the function of mussel hemocytes through rapid modulation of kinase pathways. *General and Comparative Endocrinology*. 138, 58-69.
- Cao, A., Mercado, L., Ramos-Martinez, J.I. et Barcia, R., 2003. Primary cultures of hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk: expression of IL-2Ra subunit. *Aquaculture*. 216, 1-8.
- Carballal, M.J., Lopez, C., Azevedo, C. et Villalba, A., 1997. Enzymes Involved in Defense Functions of Hemocytes of Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J Invertebr Pathol*. 70,



96-105.

- Carballal, M.J., Villalba, A. et Lopez, C., 1998. Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. *J Invertebr Pathol.* 72, 304-12.
- Cartier, S., Pellerin, J., Fournier, M., Tamigneaux, E., Girault, L. et Lemaire, N., 2004. Use of an index based on the blue mussel (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*) digestive gland weight to assess the nutritional quality of mussel farm sites. *Aquaculture.* 241, 633-654.
- Chang, S.-J., Tseng, S.-M. et Chou, H.-Y., 2005. Morphological Characterization via Light and Electron Microscopy of the Hemocytes of two Cultured Bivalves: A Comparison Study between the Hard Clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Zoological studies.* 44, 144-153.
- Cheng, T.C., 1981. Bivalves. In: *Invertebrate blood cells*, N. A. Ratcliffe et A. F. Rowley. London, Academic press: 233-299.
- Cheng, T.C. et Downs, J.C., 1988. Intracellular acid phosphatase and lysozyme levels in subpopulations of oyster, *Crassostrea virginica*, hemocytes. *J Invertebr Pathol.* 52, 163-7.
- Cheng, T.C. et Rodrick, G.E., 1975. Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Comp Biochem Physiol B.* 52, 443-7.
- Cheng, T.C. et Sullivan, J.T., 1984. Effects of heavy metals on phagocytosis by Molluscan hemocytes. *Marine Environmental Research.* 14, 305-315.
- Cheng, W., Hsiao, I.S., Hsu, C.H. et Chen, J.C., 2004. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 235-43.
- Chesworth, J.C., Donkin, M.E. et Brown, M.T., 2004. The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass *Zostera marina* (L.). *Aquatic toxicology.* 66, 293-305.
- Cho, S.-M. et Jeong, W.-G., 2005. Spawning impact on lysosomal stability of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture.* 244, 383-387.
- Christin, M.S., Gendron, A.D., Brousseau, P., Menard, L., Marcogliese, D.J., Cyr, D., Ruby, S. et Fournier, M., 2003. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. *Environ Toxicol Chem.* 22,

1127-33.

- Christin, M.S., Menard, L., Gendron, A.D., Ruby, S., Cyr, D., Marcogliese, D.J., Rollins-Smith, L. et Fournier, M., 2004. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquatic toxicology*. 67, 33-43.
- Chu, F.L., Volety, A.K., Hale, R.C. et Huang, Y., 2002. Cellular responses and disease expression in oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to suspended field contaminated sediments. *Mar Environ Res*. 53, 17-35.
- Cima, F. et Ballarin, L., 2004. Tributyltin-sulphydryl interaction as a cause of immunotoxicity in phagocytes of tunicates. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 58, 386-395.
- Couderc, J., Perrodon, Y., Ventura, M., Liacopoulos, P. et Danchin, A., 1983. Specification of the immune response: its suppression induced by chloramphenicol in vitro. *Biosci Rep*. 3, 19-29.
- Cox, E.S., Smith, M.S.R., Nell, J.A. et Maguire, G.B., 1996. Studies on triploid oysters in Australia. VI. Gonad development in diploid and triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *Journal of experimental marine biology and ecology*. 197, 101-120.
- Cunha, E.M., Oliveira, M.J., Ferreira, P.G. et Aguas, A.P., 2004. Mercury intake by inflammatory phagocytes: in vivo cytology of mouse macrophages and neutrophils by X-ray elemental microanalysis coupled with scanning electron microscopy. *Hum Exp Toxicol*. 23, 447-53.
- Daughton, C.G. et Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change ? *Environmental Health Perspectives*. 107, Supplement 6.
- De Guise, S., 2005. Immunotoxicity in marine Mammals. In: *Investigative immunotoxicology, models & approaches in Immunotoxicology*, H. Tryphonas, M. Fournier, B.R. Blakley, J. E. G. Smits et P. Brousseau, CRC Press: 63-76.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Kraffe, E., Marty, Y. et Samain, J.-F., 2005. Incorporation and modification of dietary fatty acids in gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 140, 460-470.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quéré, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C. et Samain, J.-F., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *The Journal of*

- Experimental Biology. 206, 3053-3064.
- Denis, L., Alliot, E. et Grzebyk, D., 1999. Clearance rate responses of Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to variations in the flow, water temperature, food quality and quantity. Aquatic Living Resources. 12, 279-288.
- Dieter, M.P., Luster, M.I., Boorman, G.A., Jameson, C.W., Dean, J.H. et Cox, J.W., 1983. Immunological and biochemical responses in mice treated with mercuric chloride. Toxicol Appl Pharmacol. 68, 218-28.
- Duchemin, M.B., Fournier, M. et Auffret, M., 2007. Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture. In Press, Accepted Manuscript.
- Duffy, J.E. et Zelikoff, J.T., 2005. Approaches and models for the assessment of chemical-induced immunotoxicity in Fish. In: Investigative immunotoxicology, models & approaches in Immunotoxicology, H. Tryphonas, M. Fournier, B.R.Blakley, J. E. G. Smits et P. Brousseau, CRC Press: 49-62.
- Dyrynda, E.A., Pipe, R.K. et Ratcliffe, N.A., 1997. Sub-populations of haemocytes in the adult and developing marine mussel, *Mytilus edulis*, identified by use of monoclonal antibodies. Cell Tissue Res. 289, 527-36.
- EEA, 2005. Sustainable use and management of natural resources. Agence Environnementale Européenne, Copenhagen.
- EEA, 2006. The state of the environment in the coastal areas. Agence Environnementale Européenne, Copenhagen.
- Eggleton, J. et Thomas, K.V., 2004. A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. Environ Int. 30, 973-80.
- Ellis, J.B., 2006. Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. Environmental Pollution. 144, 184-189.
- Environnement Canada, 2004. Politique de gestion des substances toxiques. Gouvernement du Canada, Ottawa.
- Escher, B.I., Bramaz, N., Eggen, R.I. et Richter, M., 2005. In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceuticals in aquatic life. Environ Sci Technol. 39, 3090-100.
- FAO, 2003. Etat de l'aquaculture dans le monde. FAO Circulaire sur les pêches. Rome, FAO. 114.
- Feng, S.Y. et Feng, J.S., 1974. The effect of temperature on cellular reactions of *Crassostrea*

- virginica* to the injection of avian erythrocytes. J Invertebr Pathol. 23, 22-37.
- Fent, K., 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. Crit Rev Toxicol. 26, 1-117.
- FIGIS, 2006. FAO. 2006.
- Figueroas, A., 2006. Cultured Aquatic Species Information Programme - *Mytilus galloprovincialis*. Cultured Aquatic Species Fact Sheets. F. I. W. R. a. A. S. F. c2004-. Rome, FAO. 2006.
- Fisher, W.S., 1986. Structure and functions of oyster hemocytes. In: Immunity in Invertebrates: cells, molecules and defense reactions, M. Brehélin. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Springer-Verlag: 25-35.
- Fisher, W.S., 1988. Disease processes in marine bivalve molluscs. American Fisheries Society, Washington.
- Flipo, D., Bernier, J., Girard, D., Krzystyniak, K. et Fournier, M., 1992. Combined effects of selected insecticides on humoral immune response in mice. Int J Immunopharmacol. 14, 747-52.
- Flipo, D., Fournier, M., Benquet, C., Roux, P., Le Boulair, C., Pinsky, C., LaBella, F.S. et Krzystyniak, K., 1998. Increased apoptosis, changes in intracellular  $Ca^{2+}$ , and functional alterations in lymphocytes and macrophages after in vitro exposure to static magnetic field. J Toxicol Environ Health A. 54, 63-76.
- Forbes, V.E. et Forbes, T.L., 1997. Écotoxicologie, théorie et applications Paris.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A. et Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. Environ Toxicol Chem. 25, 272-80.
- Ford, S.E. et Chintala, M.M., 2006. Northward expansion of a marine parasite: Testing the role of temperature adaptation. Journal of experimental marine biology and ecology. 339, 226-235.
- Ford, S.E. et Paillard, C., 2007. Repeated sampling of individual bivalve mollusks I: Intraindividual variability and consequences for haemolymph constituents of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Fish & Shellfish Immunology. 23f, 280-291.
- Fournier, M., Blakley, B., Boermans, H.J. et Brousseau, P., 2005. Toxicological considerations: making the connection between toxicologic and immunotoxicologic studies as these relate to human and ecosystem health. In: Investigative immunotoxicology, models & approaches in Immunotoxicology, H. Tryphonas, M. Fournier, B.R. Blakley, J. E. G. Smits et P. Brousseau, CRC Press: 407-420.
- Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H. et Brousseau, P., 2000a. Phagocytosis as a

- Biomarker of Immunotoxicity in Wildlife Species Exposed to Environmental Xenobiotics. *Amer. Zool.* 40, 412-420.
- Fournier, M., Cyr, D., Brousseau, P. et Tryphonas, H., 2000b. Biomarkers in Immunotoxicology: Evolutionary Perspective. In: *Environmental Endocrine Disruptors*, L. Guillette et D. Crain. New York, Taylor and Francis: 335.
- Fournier, M., Degas, V., Colborn, T., Omara, F.O., Denizeau, F., Potworowski, E.F. et Brousseau, P., 2000c. Immunosuppression in mice fed on diets containing beluga whale blubber from the St Lawrence estuary and the Arctic populations. *Toxicol Lett.* 112-113, 311-7.
- Fournier, M., Lacroix, A., Voccia, I. et Brousseau, P., 1998. Phagocytic and metabolic activities of macrophages from mummichog naturally exposed to pulp mill effluents in the Miramichi River. *Ecotoxicol Environ Saf.* 40, 177-83.
- Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y. et Brousseau, P., 2001. Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology.* 161, 201-211.
- Fournier, M., Pellerin, J., Lebeuf, M., Brousseau, P., Morin, Y. et Cyr, D., 2002. Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquatic toxicology.* 59, 83-92.
- Frazier, J.M., 1979. Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. *Environ Health Perspect.* 28, 75-9.
- Fugere, N., Brousseau, P., Krzystyniak, K., Coderre, D. et Fournier, M., 1996. Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology.* 109, 157-66.
- Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H. et Renault, T., Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish & Shellfish Immunology.* In Press, Corrected Proof.
- Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H. et Renault, T., 2006a. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 536-47.
- Gagnaire, B., Renault, T., Bouilly, K., Lapegue, S. et Thomas-Guyon, H., 2003. Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Curr Pharm Des.* 9, 193-9.
- Gagnaire, B., Soletchnik, P., Madec, P., Geairon, P., Le Moine, O. et Renault, T., 2006b.

- Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture*. 254, 606-616.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T. et Renault, T., 2006c. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biol Toxicol*. 22, 1-14.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H. et Renault, T., 2004. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*. 16, 501-512.
- Gagne, F., Blaise, C., Andre, C. et Salazar, M., 2006a. Effects of pharmaceutical products and municipal wastewaters on temperature-dependent mitochondrial electron transport activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 143, 388-393.
- Gagne, F., Blaise, C., Fournier, M. et Hansen, P.D., 2006b. Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 143, 179-86.
- Gagne, F., Blaise, C. et Hellou, J., 2004. Endocrine disruption and health effects of caged mussels, *Elliptio complanata*, placed downstream from a primary-treated municipal effluent plume for 1 year. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 138, 33-44.
- Gagne, F., Blaise, C., Pellerin, J., Pelletier, E. et Strand, J., 2006c. Health status of *Mya arenaria* bivalves collected from contaminated sites in Canada (Saguenay Fjord) and Denmark (Odense Fjord) during their reproductive period. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 64, 348-361.
- Galloway, T. et Handy, R., 2003. Immunotoxicity of Organophosphorous Pesticides. *Ecotoxicology*. 12, 345-363.
- Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Depledge, M.H. et Jones, M.B., 2006. The ECOMAN project: A novel approach to defining sustainable ecosystem function. *Marine Pollution Bulletin*. 53, 186-194.
- Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B. et Depledge, M.H., 2004. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environ Sci Technol*. 38, 1723-31.
- Galloway, T.S. et Depledge, M.H., 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and

- ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology*. 10, 5-23.
- Gasnier, H., 2004. Saint-Malo au fil du temps nouvelle édition. Henri Gasnier, Saint Malo.
- Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J. et Amiard, J.C., 2006a. Estradiol-17 $\beta$  and testosterone concentrations in male and female *Mya arenaria* (Mollusca bivalvia) during the reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol*. 145, 133-9.
- Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Fournier, M. et Amiard, J.-C., 2006b. Immunological and biochemical responses in *Mya arenaria* (Mollusca Bivalvia) exposed in vivo to estradiol-17 $\beta$ . *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 144, 228-234.
- Gendron, A.D., Marcogliese, D.J., Barbeau, S., Christin, M.S., Brousseau, P., Ruby, S., Cyr, D. et Fournier, M., 2003. Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. *Oecologia*. 135, 469-76.
- Germolec, D.R., 2004. Sensitivity and predictivity in immunotoxicity testing: immune endpoints and disease resistance. *Toxicology Letters*. 149, 109-114.
- Giamberini, L., Czembor, N. et Pihan, J.C., 1995. Inhibitory Effects of an Organic Molluscicide on Byssal Thread Development in Zebra Mussels. *Journal of Invertebrate Pathology*. 66, 205-206.
- Goedken, M. et De Guise, S., 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish & Shellfish Immunology*. 16, 539-552.
- Gomez-Mendikute, A., Etxeberria, A., Olabarrieta, I. et Cajaraville, M.P., 2002. Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene. *Mar Environ Res*. 54, 431-6.
- Gonzalez, F., Schalscha, E., Becerra, J. et Silva, M., 2002. Mercury in a marine trophic chain. *Bull Environ Contam Toxicol*. 68, 448-54.
- Gosling, E., 2003. Bivalve molluscs Biology, Ecology and Culture. Blackwell Science.
- Goulletquer, P., 2006. Cultured Aquatic Species Information Programme - *Mytilus edulis*. Cultured Aquatic Species Fact Sheets. F. I. W. R. a. A. S. F. c2004-. Rome, FAO. 2006.
- Goven, A.J., Venables, B.J. et Fitzpatrick, L.C., 2005. Earthworms as ecosentinels for chemical-induced immunotoxicity. In: *Investigative immunotoxicology, models & approaches in Immunotoxicology*, H. Tryphonas, M. Fournier, B.R. Blakley, J. E. G. Smits et P. Brousseau, CRC Press: 91-106.
- Hagger, J.A., Depledge, M.H. et Galloway, T.S., 2005. Toxicity of tributyltin in the marine

- mollusc *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin*. 51, 811-816.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H. et Soudant, P., 2003a. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation I. Haemocyte types and morphology. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 293, 237-248.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H. et Soudant, P., 2003b. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocytes functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 293, 249-265.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., Delaporte, M., Alix, J.H., Smith, B.C., Dixon, M.S., Quere, C., LeCoz, J.R., Paillard, C., Moal, J. et Samain, J.F., 2004. Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation. *Aquaculture*. 234, 541-560.
- Hine, P.M., 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*. 9, 367-385.
- Hoeger, B., van den Heuvel, M.R., Hitzfeld, B.C. et Dietrich, D.R., 2004. Effects of treated sewage effluent on immune function in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology*. 70, 345-355.
- Horvat, M., Covelli, S., Faganeli, J., Logar, M., Mandic, V., Rajar, R., Sirca, A. et Zagar, D., 1999. Mercury in contaminated coastal environments; a case study: the Gulf of Trieste. *Sci Total Environ*. 237-238, 43-56.
- Huet, M., Paulet, Y.M. et Glemarec, M., 1996. Tributyltin (TBT) pollution in the coastal waters of west Brittany as indicated by imposex in *Nucella lapillus*. *Marine Environmental Research*. 41, 157-167.
- Hugo, P., Bernier, J., Krzystyniak, K. et Fournier, M., 1988a. Transient inhibition of mixed lymphocyte reactivity by dieldrin in mice. *Toxicol Lett*. 41, 1-9.
- Hugo, P., Bernier, J., Krzystyniak, K., Potworowski, E.F. et Fournier, M., 1988b. Abrogation of graft-versus-host reaction by dieldrin in mice. *Toxicol Lett*. 41, 11-22.
- Huvet, A., Gerard, A., Ledu, C., Phelipot, P., Heurtebise, S. et Boudry, P., 2002. Is fertility of hybrids enough to conclude that the two oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* are the same species? *Aquatic Living Resources*. 15, 45-52.
- Hylander, L.D. et Goodsite, M.E., 2006. Environmental costs of mercury pollution. *Sci Total Environ*.



- IPCS, 1976. Environment Health Criteria 1. Mercury. WHO, Geneva.
- IPCS, 1991. Environment Health Criteria 118. Inorganic mercury. WHO, Geneva.
- IPCS, 1993. Environment Health Criteria 155. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. WHO, Geneva.
- IPCS, 1996. Environmental Health Criteria 180. Principles and Methods for assessing direct immunotoxicity associated with exposure to chemicals. Geneva, WHO. 142.
- IPCS, 2001. Environmental Health Criteria 222. Biomarkers in risk assessment: validity and validation. Geneva, WHO. 142.
- Jeong KH, Lie KJ et D, H., 1983. The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. Developmental and comparative immunology. 7, 217-228.
- Jing, X. et Wenbin, Z., 2005. Characterisation of monoclonal antibodies to haemocyte types of scallop (*Chlamys farreri*). Fish & Shellfish Immunology. 19, 17-25.
- Jing, X. et Wenbin, Z., 2006. Comparison of antigenicity among haemocytes of seven bivalve species by monoclonal antibodies against haemocytes of scallop (*Chlamys farreri*). Fish Shellfish Immunol. 20, 528-35.
- Kazantzis, G., 2002. Mercury exposure and early effects: an overview. Med Lav. 93, 139-47.
- Kehrig, H.A., Costa, M., Moreira, I. et Malm, O., 2001. Methylmercury and total mercury in estuarine organisms from Rio de Janeiro, Brazil. Environ Sci Pollut Res Int. 8, 275-9.
- Kesarcodi-Watson, A., Klumpp, D.W. et Lucas, J.S., 2001a. Comparative feeding and physiological energetic in diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*): II. Influences of food concentration and tissue energy distribution. Aquaculture. 203, 195-216.
- Kesarcodi-Watson, A., Lucas, J.S. et Klumpp, D.W., 2001b. Comparative feeding and physiological energetic of diploid and triploid Sydney rock oysters, *Saccostrea commercialis*: I. Effects of oyster size. Aquaculture. 203, 177-193.
- Krzystyniak, K., Bernier, J., Hugo, P. et Fournier, M., 1986. Suppression of MHV3 virus-activated macrophages by dieldrin. Biochem Pharmacol. 35, 2577-86.
- Krzystyniak, K., Flipo, D., Mansour, S. et Fournier, M., 1989. Suppression of avidin processing and presentation by mouse macrophages after sublethal exposure to dieldrin. Immunopharmacology. 18, 157-66.
- Krzystyniak, K., Fournier, M., Trottier, B., Nadeau, D. et Chevalier, G., 1987. Immunosuppression in mice after inhalation of cadmium aerosol. Toxicol Lett. 38, 1-12.

- Krzystyniak, K., Tryphonas, H. et Fournier, M., 1995. Approaches to the evaluation of chemical-induced immunotoxicity. *Environ Health Perspect.* 103 Suppl 9, 17-22.
- Lacroix, A., Fournier, M., Lebeuf, M., Nagler, J.J. et Cyr, D.G., 2001. Phagocytic response of macrophages from the pronephros of American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) exposed to contaminated sediments from Baie des Anglais, Quebec. *Chemosphere.* 45, 599-607.
- Lagadic, L., Caquet, T. et Amiard, J.-C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In: *Biomarqueurs en écotoxicologie - aspects fondamentaux*, L. Lagadic, T. Caquet, J. C. Amiard et F. Ramade. Paris, Masson: 1-10.
- Lalancette, A., Morin, Y., Measures, L. et Fournier, M., 2003. Contrasting changes of sensitivity by lymphocytes and neutrophils to mercury in developing grey seals. *Dev Comp Immunol.* 27, 735-47.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G. et Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish & Shellfish Immunology.* 15, 225-240.
- Lehmann, A.K., Sornes, S. et Halstensen, A., 2000. Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *journal of immunological methods.* 243, 229-242.
- Leinio, S. et Lehtonen, K.K., 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* 140, 408-421.
- Lemaire, N., Pellerin, J., Fournier, M., Girault, L., Tamigneaux, E., Cartier, S. et Pelletier, E., 2006. Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *Mytilus* spp. from farm sites of eastern Quebec. *Aquaculture.* 261(2), 729-751.
- Li, J., Barreda, D.R., Zhang, Y.-A., Boshra, H., Gelman, A.E., LaPatra, S., Tort, L. et Sunyer, J.O., 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *7*, 1116-1124.
- Lishman, L., Smyth, S.A., Sarafin, K., Kleywegt, S., Toito, J., Peart, T., Lee, B., Servos, M., Beland, M. et Seto, P., 2006. Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Science of The Total Environment.* 367, 544-558.
- Little, T.J., Hultmark, D. et Read, A.F., 2005. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nature Immunology.* 6, 651-654.
- Lockhart, W.L., Stern, G.A., Low, G., Hendzel, M., Boila, G., Roach, P., Evans, M.S.,

- Billeck, B.N., DeLaronde, J., Friesen, S., Kidd, K., Atkins, S., Muir, D.C., Stoddart, M., Stephens, G., Stephenson, S., Harbicht, S., Snowshoe, N., Grey, B., Thompson, S. et DeGraff, N., 2005. A history of total mercury in edible muscle of fish from lakes in northern Canada. *Sci Total Environ.* 351-352, 427-63.
- Lowe, D.M. et Fossato, V.U., 2000. The influence of environmental contaminants on lysosomal activity in the digestive cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon. *Aquatic Toxicol.* 48, 75-85.
- Lowe, D.M., Soverchia, C. et Moore, M.N., 1995. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic toxicology.* 33, 105-112.
- Lubet, P., 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilidés et les pectinidés. *Rev. Trav. Inst STPM.* 23 (4), 396-545.
- Luebke, R.W., Hodson, P.V., Faisal, M., Ross, P.S., Grasman, K.A. et Zelikoff, J., 1997. Aquatic pollution-induced immunotoxicity in wildlife species. *Fundam Appl Toxicol.* 37, 1-15.
- Luengen, A.C., Friedman, C.S., Raimondi, P.T. et Flegal, A.R., 2004. Evaluation of mussel immune responses as indicators of contamination in San Francisco Bay. *Marine Environmental Research.* 57, 197-212.
- Luster, M.I., Portier, C., Pait, D.G., Rosenthal, G.J., Germolec, D.R., Corsini, E., Blaylock, B.L., Pollock, P., Kouchi, Y., Craig, W. et al., 1993. Risk assessment in immunotoxicology. II. Relationships between immune and host resistance tests. *Fundam Appl Toxicol.* 21, 71-82.
- Luster, M.I., Portier, C., Pait, D.G., White, K.L., Jr., Gennings, C., Munson, A.E. et Rosenthal, G.J., 1992. Risk assessment in immunotoxicology. I. Sensitivity and predictability of immune tests. *Fundam Appl Toxicol.* 18, 200-10.
- Ma, M., Rao, K. et Wang, Z., Occurrence of estrogenic effects in sewage and industrial wastewaters in Beijing, China. *Environmental Pollution.* In Press, Corrected Proof.
- Magnusson, K., Ekelund, R., Grabic, R. et Bergqvist, P.A., 2006. Bioaccumulation of PCB congeners in marine benthic infauna. *Mar Environ Res.* 61, 379-95.
- Marchand, J., Tanguy, A., Charrier, G., Quiniou, L., Plee-Gauthier, E. et Laroche, J., 2006. Molecular Identification and Expression of Differentially Regulated Genes of the European Flounder, *Platichthys flesus*, Submitted to Pesticide Exposure. *Mar Biotechnol (NY).* 8, 275-94.

- Marchand, M. et Tissier, C., 2005. Analyse du risque chimique en milieu marin. L'approche méthodologique européenne. IFREMER.
- Marchi, B., Burlando, B., Moore, M.N. et Viarengo, A., 2004. Mercury- and copper-induced lysosomal membrane destabilisation depends on  $[Ca^{2+}]_i$  dependent phospholipase A2 activation. *Aquat Toxicol.* 66, 197-204.
- Massicotte, R., Robidoux, P.Y., Sauve, S., Flipo, D., Fournier, M. et Trottier, B., 2003. Immune response of earthworms (*Lumbricus terrestris*, *Eisenia andrei* and *Aporrectodea tuberculata*) following in situ soil exposure to atmospheric deposition from a cement factory. *J Environ Monit.* 5, 774-9.
- Massicotte, R., Robidoux, P.Y., Sauve, S., Flipo, D., Mathiot, A., Fournier, M. et Trottier, B., 2004. Immunotoxicological response of the earthworm *Lumbricus terrestris* following exposure to cement kiln dusts. *Ecotoxicol Environ Saf.* 59, 10-6.
- MEDD, 2006. Réglementation des produits biocides, Ministère de l'écologie et du développement durable. 2006.
- Meng, P.J., Wang, J.T., Liu, L.L., Chen, M.H. et Hung, T.C., 2005. Toxicity and bioaccumulation of tributyltin and triphenyltin on oysters and rock shells collected from Taiwan mariculture area. *Sci Total Environ.* 349, 140-9.
- Menzies, G., 2002. 1421 - The year China discovered the world. Batam Press, London.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F. et Roch, P., 2000. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Letters.* 486, 185-190.
- Mondal, T.K., Li, D., Swami, K., Dean, J.K., Hauer, C. et Lawrence, D.A., 2005. Mercury impairment of mouse thymocyte survival in vitro: involvement of cellular thiols. *J Toxicol Environ Health A.* 68, 535-56.
- Monperrus, M., Point, D., Grall, J., Chauvaud, L., Amouroux, D., Bareille, G. et Donard, O., 2005. Determination of metal and organometal trophic bioaccumulation in the benthic macrofauna of the Adour estuary coastal zone (SW France, Bay of Biscay). *J Environ Monit.* 7, 693-700.
- Moore, C.A. et Gelder, S.R., 1985. Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca : Bivalvia). *Transactions of the American Microscopy Society.* 104, 242-249.
- Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W. et Leonard, D.R.P., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanisms of*

- Mutagenesis. 552, 247-268.
- Moore, M.N., Lowe, D.M. et Fieth, P.E.M., 1978. Lysosomal responses to experimentally injected anthracene in the digestive cells of *Mytilus edulis*. *Marine Biology*. 48, 297-302.
- Moszczyński, P., 1997. Mercury compounds and the immune system: a review. *Int J Occup Med Environ Health*. 10, 247-58.
- MPO, 2003. Ministère des Pêches et Océan.
- Munoz, P., Meseguer, J. et Esteban, M.A., 2006. Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 20, 12-19.
- Narbonne, J.-F. et Michel, X., 1997. Systèmes de biotransformations chez les mollusques aquatiques. In: *Biomarqueurs en écotoxicologie - aspects fondamentaux*, L. Lagadic, T. Caquet, J. C. Amiard et F. Ramade. Paris, Masson: 11-32.
- Nell, J.A., 2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture*. 210, 69-88.
- Nelson, D.A., Miller, J.E. et Calabrese, A., 1988. Effect of heavy metals on bay scallops, surf clams, and blue mussels in acute and long-term exposures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. V17, 595-600.
- Nieto-Fernandez, F.E., Alcide, K. et Rialas, C., 2000. Heavy metals and neuroimmunomodulation in *Mytilus edulis*. *Acta Biol Hung*. 51, 325-9.
- Noel, D., Pipe, R., Elston, R., BachÃˆre, E. et Mialhe, E., 1994. Antigenic characterization of hemocyte subpopulations in the mussel, *Mytilus edulis*, by means of monoclonal antibodies. *Marine Biology*. 119, 549-556.
- Oliver, L.M. et Fisher, W.S., 1999. Appraisal of prospective bivalve immunomarkers. *Biomarkers*. 4, 510-530.
- Oliver, L.M., Fisher, W.S., Winstead, J.T., Hemmer, B.L. et Long, E.R., 2001. Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. *Aquatic toxicology*. 55, 203-222.
- OSPAR, C., 2000. Bilan de santé 2000. Commission OSPAR, London.
- OSPAR, C., 2006. Overview of OSPAR Assessments 1998 – 2006. London, Commission OPSAR. 90.
- Ottaviani, E., 2004. The mollusc as a suitable model for mammalian immune-neuroendocrine investigations. *Italian Science Journal*. 1, 2-4.
- Ottaviani, E., 2006. Molluscan immunorecognition. *Italian Science Journal*. 3, 50-63.

- Page, D.S. et Widdows, J., 1991. Temporal and spatial variation in levels of alkyltins in mussel tissues: A toxicological interpretation of field data. *Marine Environmental Research*. 32, 113-129.
- Paillard, C., Allam, B. et Oubella, R., 2004. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 59, 249-262.
- Parry, H.E. et Pipe, R.K., 2004. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat Toxicol*. 69, 311-25.
- Petersen, J., Kjerulf, Bougrier, S., Smaal, A.C., Garen, P., Robert, S., Larsen, J.E.N. et Brummelhuis, E.B.M., 2004. Intercalibration of mussel, *Mytilus edulis*, clearance rate measurements. *Marine Ecology Progress Series* 267 (2004).
- Petrovic, S., Semencic, L., Ozretic, B. et Ozretic, M., 2004. Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north adriatic coastal waters (Croatia). *Marine Pollution Bulletin*. 49, 713-720.
- Phinney, D.A. et Cucci, T.L., 1989. Flow cytometry and phytoplankton. *Cytometry*. 10, 511-21.
- Pillet, S., D'Elia, M., Bernier, J., Bouquegneau, J.M., Fournier, M. et Cyr, D.G., 2006. Immunomodulatory effects of estradiol and cadmium in adult female rats. *Toxicol Sci*. 92, 423-32.
- Pillet, S., Fournier, M., Measures, L.N., Bouquegneau, J.M. et Cyr, D.G., 2002. Presence and regulation of metallothioneins in peripheral blood leukocytes of grey seals. *Toxicol Appl Pharmacol*. 185, 207-17.
- Pillet, S., Rooney, A.A., Bouquegneau, J.M., Cyr, D.G. et Fournier, M., 2005. Sex-specific effects of neonatal exposures to low levels of cadmium through maternal milk on development and immune functions of juvenile and adult rats. *Toxicology*. 209, 289-301.
- Pipe, R., Coles, J.A. et Farley, S.R., 1995a. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. In: *Techniques in fish immunology*, J. S. Stolen, T. C. Fletcher, S. A. Smith et al. Fair Haven, NJ, USA, SOS publications. 4: 93-100.
- Pipe, R.K., 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev Comp Immunol*. 16, 111-22.
- Pipe, R.K. et Coles, J.A., 1995. Environmental contaminants influencing immune function in

- marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology*. 5, 581-595.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., Carissan, F.M.M. et Ramanathan, K., 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic toxicology*. 46, 43-54.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., Thomas, M.E., Fossato, V.U. et Pulsford, A.L., 1995b. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. *Aquatic toxicology*. 32, 59-73.
- Pipe, R.K., Farley, S.R. et Coles, J.A., 1997. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res*. 289, 537-45.
- Platt, T., 1989. Flow cytometry in oceanography. *Cytometry*. 10, 500.
- Pouvreau, S., Bourles, Y., Lefebvre, S., Gangnery, A. et Alunno-Bruscia, M., 2006. Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared under various environmental conditions. *Journal of Sea Research*. 56, 156-167.
- Prater, M.R., Gogal, R.M., Jr., Blaylock, B.L., Longstreth, J. et Holladay, S.D., 2002. Single-dose topical exposure to the pyrethroid insecticide, permethrin in C57BL/6N mice: effects on thymus and spleen. *Food Chem Toxicol*. 40, 1863-73.
- Quinn, B., Gagne, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J. et Mothersill, C., 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquat Toxicol*. 66, 279-92.
- Rajagopal, S., van der Velde, G., van der Gaag, M. et Jenner, H.A., 2005. Byssal detachment underestimates tolerance of mussels to toxic compounds. *Mar Pollut Bull*. 50, 20-9.
- Renault, T., Xue, Q.G. et Chilmonczyk, S., 2001. Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. *Fish Shellfish Immunol*. 11, 269-74.
- Richter-Reichhelm, H.-B., Stahlmann, R., Smith, E., van Loveren, H., Althoff, J., Bass, R., Corsini, E., Dayan, A., Dean, J.H. et Descotes, J., 2001. Approaches to risk assessment of immunotoxic effects of chemicals. *Toxicology*. 161, 213-228.
- Riisgård, H.U., 2001. On measurement of filtration rates in bivalves-the stony road to reliable data: review and interpretation. *Marine Ecology Progress Series*. 211, 275-291.
- Riisgård, H.U., Kittner, C. et Seerup, D.F., 2003. Regulation of opening state and filtration rate in filter-feeding bivalves (*Cardium edule*, *Mytilus edulis*, *Mya arenaria*) in response to low algal concentration. *Journal of Experimental Marine Biology and*

- Ecology. 284, 105-127.
- Riisgård, H.U., Kittner, C. et Seerup, D.F., 2003. Regulation of opening state and filtration rate in filter-feeding bivalves (*Cardium edule*, *Mytilus edulis*, *Mya arenaria*) in response to low algal concentration. Journal of experimental marine biology and ecology. 284, 105-127.
- Rollins-Smith, L.A. et Smits, J.E.G., 2005. Amphibian models and Approaches to immunotoxicology. In: Investigative immunotoxicology, models & approaches in Immunotoxicology, H. Tryphonas, M. Fournier, B.R.Blakley, J. E. G. Smits etP. Brousseau, CRC Press: 77-90.
- Rooney, A.A., 2005. Reptiles: the research potential of an overlooked taxon in immunotoxicology. In: Investigative immunotoxicology, models & approaches in Immunotoxicology, H. Tryphonas, M. Fournier, B.R.Blakley, J. E. G. Smits etP. Brousseau, CRC Press: 107-128.
- Rooney, A.A., Fournier, M., Bernier, J. et Cyr, D.G., 2003. Neonatal exposure to propylthiouracil induces a shift in lymphoid cell sub-populations in the developing postnatal male rat spleen and thymus. Cell Immunol. 223, 91-102.
- Russo, J. et Lagadic, L., 2004. Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). Environmental Pollution. 127, 303-311.
- Rutten, T.P., Sandee, B. et Hofman, A.R., 2005. Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: a successful approach? Cytometry A. 64, 16-26.
- Salo, H., Dautremepuis, C., Smits, J.E.G., Brousseau, P. et Fournier, M., 2005. Immune markers in ecotoxicology: a comparison across species. In: Investigative immunotoxicology, models & approaches in Immunotoxicology, H. Tryphonas, M. Fournier, B.R.Blakley, J. E. G. Smits etP. Brousseau, CRC Press: 147-162.
- Sauve, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Senecal, L., Goudreau, P. et Fournier, M., 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). Aquatic toxicology. 58, 189-200.
- Sauve, S. et Fournier, M., 2005. Age-specific immunocompetence of the earthworm *Eisenia andrei*: exposure to methylmercury chloride. Ecotoxicology and Environmental Safety. 60, 67-72.
- Savini, I., 2005. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Rapport d'expertise scientifique



- collective. J. N. Aubertot, J. M. Barbier, A. Carpentier *et al*, CEMAGREF - INRA. 64.
- Scheringer, M., 2007. Towards an Intergovernmental Panel on Chemical Pollution (IPCP). *Chemosphere*. 67, 1682-3.
- Scheringer, M., Fiedler, H., Suzuki, N., Holoubek, I., Zetzsch, C. et Bergman, A., 2006. Initiative for an International Panel on Chemical Pollution (IPCP). *Environ Sci Pollut Res Int*. 13, 432-4.
- SEGHIER, C., 2007. Trois organisations demandent l'interdiction mondiale du mercure. Actu-environnement.
- Selgrade, M.K., 1999. Use of immunotoxicity data in health risk assessments: uncertainties and research to improve the process. *Toxicology*. 133, 59-72.
- Selgrade, M.K., 2005. Biomarkers of effects: the immune system. *J Biochem Mol Toxicol*. 19, 177-9.
- Shpigel, M., Barber, B.J. et Mann, R., 1992. Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 161, 15-25.
- Shumway, S.E., Cucci, T.L., Newell, R.C. et Yentsch, C.M., 1985. Particle selection, ingestion, and absorption in filter-feeding bivalves. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 91, 77-92.
- Siah, A., Pellerin, J., Amiard, J.C., Pelletier, E. et Viglino, L., 2003. Delayed gametogenesis and progesterone levels in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in relation to in situ contamination to organotins and heavy metals in the St. Lawrence River (Canada). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 135, 145-56.
- Silva, I.A., Graber, J., Nyland, J.F. et Silbergeld, E.K., 2005. In vitro HgCl<sub>2</sub> exposure of immune cells at different stages of maturation: effects on phenotype and function. *Environ Res*. 98, 341-8.
- Smaal, A.C., Wagenvoort, A., Hemelraad, J. et Akkerman, I., 1991. Response to stress of mussels (*Mytilus edulis*) exposed in Dutch tidal waters. *Comp Biochem Physiol C*. 100, 197-200.
- Smits, J.E.G., 2005. Immunotoxicology in terrestrial wildlife. In: Investigative immunotoxicology, models & approaches in Immunotoxicology, H. Tryphonas, M. Fournier, B.R. Blakley, J. E. G. Smits et P. Brousseau, CRC Press: 129-146.
- Sobral, P. et Widdows, J., 1997. Effects of Copper Exposure on the Scope for Growth of the

- Clam *Ruditapes decussatus* from Southern Portugal. Marine Pollution Bulletin. 34, 992-1000.
- Sokal, R.R. et Rohlf, F.J., 1995. Biometry - The principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Company, New-York.
- Soudant, P., Paillard, C., Choquet, G., Lambert, C., Reid, H.I., Marhic, A., Donaghy, L. et Birkbeck, T.H., 2004. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis* (= *Tapes*, = *Ruditapes*) *philippinarum*. Aquaculture. 229, 401-418.
- Stratégie communautaire sur le mercure, 2005. COM(2005). 13.
- Sweet, L.I. et Zelikoff, J.T., 2001. Toxicology and immunotoxicology of mercury: a comparative review in fish and humans. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 4, 161-205.
- Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J. et Moraga, D., 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. Febs J. 272, 390-403.
- Toepel, J., Wilhelm, C., Meister, A., Becker, A. et Martinez-Ballesta Mdel, C., 2004. Cytometry of freshwater phytoplankton. Methods Cell Biol. 75, 375-407.
- Torreilles, J., Guerin, M.C. et Roch, P., 1997. Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. Dev Comp Immunol. 21, 267-75.
- Tryphonas, H., Fournier, M., Lacroix, F., McGuire, P., Hayward, S., Bryce, F., Flipo, D. et Arnold, D.L., 1998a. Effects of Great Lakes fish consumption on the immune system of Sprague-Dawley rats investigated during a two-generation reproductive study. Regul Toxicol Pharmacol. 27, S40-54.
- Tryphonas, H., McGuire, P., Fernie, S., Miller, D., Stapley, R., Bryce, F., Arnold, D.L. et Fournier, M., 1998b. Effects of Great Lakes fish consumption on the immune system of Sprague-Dawley rats investigated during a two-generation reproductive study. Regul Toxicol Pharmacol. 27, S28-39.
- Tu, C.-Y., Hung, S.-W., Tsou, L.-T., Chang, Y.-C. et Wang, W.-S., 2007. Simultaneous flow cytometric assessment for cellular types and phagocytic abilities of the haemocytes of the hard clam, *Meretrix lusoria*. Fish & Shellfish Immunology. 23, 16-23.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitteilungen-Internationale Vereinigung für Limnologie. 9, 1-38.

- van der Meer, J., 2006. An introduction to Dynamic Energy Budget (DEB) models with special emphasis on parameter estimation. *Journal of Sea Research*. 56, 85-102.
- van der Oost, R., Beyer, J. et Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13, 57-149.
- van der Veer, H.W., Cardoso, J.F.M.F. et van der Meer, J., 2006. The estimation of DEB parameters for various Northeast Atlantic bivalve species. *Journal of Sea Research*. 56, 107-124.
- Voccia, I., Blakley, B., Brousseau, P. et Fournier, M., 1999. Immunotoxicity of pesticides: a review. *Toxicol Ind Health*. 15, 119-32.
- Vrana, B., Mills, G.A., Kotterman, M., Leonards, P., Booij, K. et Greenwood, R., Modelling and field application of the Chemcatcher passive sampler calibration data for the monitoring of hydrophobic organic pollutants in water. *Environmental Pollution*. In Press, Corrected Proof.
- Wade, M.G., Foster, W.G., Younglai, E.V., McMahon, A., Leingartner, K., Yagminas, A., Blakey, D., Fournier, M., Desaulniers, D. et Hughes, C.L., 2002. Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune, and reproductive effects. *Toxicol Sci*. 67, 131-43.
- Weyts, F.A.A., Cohen, N., Flik, G. et Verburg-van Kemenade, B.M.L., 1999. Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 9, 1-20.
- Widdows, J. et Donkin, P., 1991. Role of physiological energetics in ecotoxicology. *Comp Biochem Physiol C*. 100, 69-75.
- Woolhiser, M.R., Henry, K.S. et Holsapple, M.P., 2005. Ecoimmunotoxicology: state of science. In: *Investigative immunotoxicology*, H. Tryphonas, M. Fournier, B. Blakley, J. E. G. Smits et P. Brousseau, CRC press book: 13-28.
- Wootton, E.C., Dyrinda, E.A. et Ratcliffe, N.A., 2003. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish & Shellfish Immunology*. 15, 195-210.
- WWF, 2005. The tip of the iceberg: Chemical contamination in the Arctic. Oslo, World Wide Foundation International Arctic Programme. 45.
- Xing, J. et Zahn, W.-b., 2005. Localization on hematopoietic tissue of scallop, *Chlamys farreri*. *Journal of Fisheries of China*. 29, 145-149.

- Xue, Q.-G., Renault, T. et Chilmoneczyk, S., 2001. Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. *Fish & Shellfish Immunology*. 11, 557-567.
- Zaroogian, G. et Yevich, P., 1994. The nature and function of the brown cell in *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research*. 37, 355-373.
- Zelikoff, J.T., Smialowicz, R., Bigazzi, P.E., Goyer, R.A., Lawrence, D.A., Maibach, H.I. et Gardner, D., 1994. Immunomodulation by metals. *Fundam Appl Toxicol*. 22, 1-7.
- Zhang, Z., Zhan, W., Xue, Y. et Xing, J., 2004. Antigenic cross-reactivity of crustacean haemocytes using monoclonal antibodies produced against haemocytes of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunology*. 16, 71-73.
- Zhu, W., Mantione, K., Jones, D., Salamon, E., Cho, J.J., Cadet, P. et Stefano, G.B., 2003. The presence of 17-beta estradiol in *Mytilus edulis* gonadal tissues: evidence for estradiol isoforms. *Neuro Endocrinol Lett*. 24, 137-40.
- Zola, H., 2000. Immunological applications of flow cytometry. *journal of immunological methods*. 243, 1-2.



# *Annexes*

---



## **I. Les zones côtières, un contexte humain et social**

### **A. Les zones côtières, berceaux de nos civilisations**

Les zones côtières ont toujours été des sites privilégiés d'activités humaines. Que ce soit le pourtour méditerranéen, qualifié de berceau des civilisations occidentales, ou encore en mer de Chine pour les civilisations orientales, c'est le long des côtes qu'ont migré les premiers hommes puis que se sont forgées de puissantes civilisations. Pendant longtemps, la puissance d'une civilisation était principalement estimée à partir de la capacité de sa marine militaire et commerciale.

La pêche, au harpon, à la ligne ou au filet, a sûrement été l'une des premières activités humaines dans ces zones, en témoignent les fouilles archéologiques d'anciens villages néolithiques et de l'Âge de Bronze. Artisanale, elle était l'équivalent de la chasse, à terre, et pouvait profiter de la richesse et de l'abondance de la mer. Au gré des innovations scientifiques et technologiques pour la maîtrise du milieu marin, la pêche, l'exploration, puis le commerce, se sont développés sans discontinuité pendant des milliers d'années. Poussées par les vents, des caravanes de navires appareillaient à des fins scientifiques, militaires ou commerciales vers des destinations de plus en plus éloignées. Les vikings, puis Jacques Cartier, ont découvert l'Est du Canada et ses côtes poissonneuses. En remontant haut dans les terres sur le fleuve Saint Laurent, les Français ont développé ainsi le commerce de peaux avec les Premières Nations. De récentes données archéologiques et génétiques sur la côte Ouest canadienne, supposent qu'à la même époque, l'amiral chinois Zheng He mena pendant 28 ans, des expéditions maritimes pacifiques de grande envergure, vers le continent américain, l'Australie, les pôles et le cap de Bonne Espérance (Menziès, 2002). Comme dans le reste de l'Europe, la Compagnie des Indes Orientales, fondée par Colbert a fait la renommée de Lorient ou encore celle de ces « Messieurs de Saint Malo » (Gasnier, 2004).

Places stratégiques de premier ordre pour toute puissance digne de ce nom, les ports ont été le champ de bataille de nombreuses guerres pour permettre le contrôle du transit maritime, l'accès vers de nouvelles destinations ou encore, la protection des navires commerciaux alliés face au pillage des pirates ou des corsaires malouins. Mais, les ports ont aussi été des creusets civilisateurs en permettant des échanges avec des négociants, des scientifiques, des ambassadeurs de cultures différentes. Le port fut alors aussi un lieu de prestige et de rayonnement pour une puissance. Le port d'Alexandrie, avec son phare et sa



bibliothèque, en reste sûrement le plus bel exemple.

### ***B. Les zones côtières, exutoire des civilisations***

Avec la révolution industrielle, à partir de la moitié du 19<sup>ème</sup> siècle, les zones côtières se sont confortées comme des zones économiques privilégiées. L'intensité des activités traditionnelles (pêche ou aquaculture), industrielles (transport maritime, travaux maritimes), et le développement de nouvelles activités (tourisme et loisirs) ont certes développé localement l'économie, mais ont aussi eu des répercussions économiques qui dépassent largement les frontières de la région. Ainsi, le poids économique de valeur produite par la « France maritime » représente 35 milliards d'euros en 2005 et 315 000 emploi directs dans tous les métiers de la mer et métiers connexes (assurances, banques, bureaux d'étude, etc.) qui forment le cluster maritime français (IFM, 2005). Ce chiffre ne prend pas en compte, par contre, les retombées économiques de ces activités sur l'économie des territoires qui dépendent de l'accès à un port. Malheureusement, ces zones privilégiées d'activités humaines, nécessaires et profitables à la société, génèrent intrinsèquement des perturbations. En conséquence, l'intensification de ces activités augmente également la pression anthropique sur l'environnement marin et ses ressources. Elle peut également mettre en péril le développement durable, à court terme et à long terme, de ces activités. Outre les pollutions accidentelles liées à la nature des cargaisons, le transport maritime est intrinsèquement source de perturbations que ce soit par l'établissement et l'entretien de voies navigables comme par l'utilisation de peintures antisalissures. D'autre part, les zones côtières sont aussi affectées par les risques chimiques des activités industrielles et agricoles installées dans ces régions, mais aussi dans les zones situées en amont des fleuves et des rivières émissaires des bassins versants. La contamination de l'environnement marin peut se faire aussi à l'interface air-eau par des polluants atmosphériques. Enfin, la présence et le mode de vie même de la population côtière peuvent perturber l'environnement marin. En effet, les nouvelles substances émergentes issues de l'utilisation de produits pharmaceutiques et cosmétiques se retrouvent dans la colonne d'eau.

### ***C. Les générations futures***

Considérant alors le millier de nouvelles molécules organiques mises sur le marché

chaque année, le flux démographique croissant vers les zones côtières ainsi que les activités humaines connexes, les écosystèmes marins sont indéniablement soumis à une pression anthropique, de nature entropique. Cette pression et ces facteurs aggravants ont leur rôle dans le « changement global ». Ce terme intègre le changement climatique accéléré par les activités humaines, mais aussi le changement de la qualité de l'environnement dans lequel l'Homme évolue. Une approche systémique, par exemple, de l'augmentation de la fréquence des tempêtes en hiver qui remettent en suspension dans la colonne d'eau des contaminants, jusque-là séquestrés dans les sédiments et agir ainsi sur la qualité de la ressource (Lacroix *et al.*, 2001; Fournier *et al.*, 2002). De la même façon, que penser de la remise en suspension massive de sédiments lors d'événements telluriques ou météorologiques extraordinaires et sa conséquence sur la prise en considération de la santé des populations locales dans l'étape de reconstruction ?

### **Références**

## **MORTALITÉ HÉMOCYTAIRE - TEST IP**

Matériel nécessaire :





- SAAH (réfrigérateur)
- Iodure de propidium (solution stock dans la porte du réfrigérateur à concentration de travail  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ )
- 1 pipette automatique Eppendorf®
- 1 pipetman Gilson ® + embouts (125µl, 1250 µl et 12,5 mL)
- 1 tube faclon ® 5 mL par huître
- glace pilée
- boîte polystyrène + couvercle

Temps minimum : 10 min

- 200 µl de SAAH (solution antiagrégante) avec la pipette automatique Eppendorf® par tube
- 50 µl d'hémolymph par tube
- Quand l'hémolymph a été ajoutée à tous les tubes, ajouter 2,5 µl de IP avec le pipetman® + embout 125µl Concentration finale d'IP :  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$
- Laisser incuber 10 min dans la glace dans le noir
- Passer au cytomètre sur FL-3 H (settings moule\_IP\_DIOC)

## PHAGOCYTOSE

Temps minimum : 4h25.

- Déposer 100  $\mu$ l d'hémolymph au fond de 2x5 puits d'une plaque 96 puits maintenu sur glace
- Vérifier la concentration au cytomètre avec IP et DIOC 
- Ajouter la solution de billes pour avoir 30 billes pour un hémocyte.:
- Centrifuger à 1250 rpm pendant 10 min à 4 °C 
- Incuber les plaques à 15 °C ( $t_0$ ) pendant 4 heures 
- ajouter 10  $\mu$ l de SAAH-trypsine 5x 
- laisser incuber pendant 5 min à 25 °C
- ajouter 10  $\mu$ l d'hémofix (1 :10)

## PROTOCOLE *IN TUBO*

Objet : *le protocole in tubo permet l'exposition individuelle de moules mesurant entre 4 et 5 cm pendant 24 heures. Il permet d'utiliser des volumes moindres de toxiques. La mesure de la clairance d'une eau riche en phytoplancton peut être faite à la fin de l'exposition pour donner un indicateur physiologique global de la moule.*

### Mise en place

Une plaque (polystyrène, bois) percée de trous de 30mm exactement, équidistants les uns des autres, est posée sur un bac rempli d'eau de mer circulant. Ce bac agit comme un thermostat (Cf Figure 1).

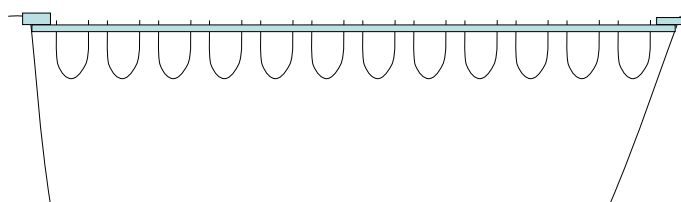
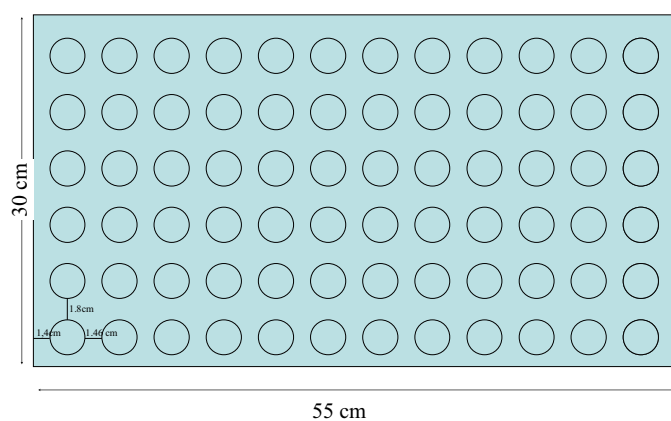
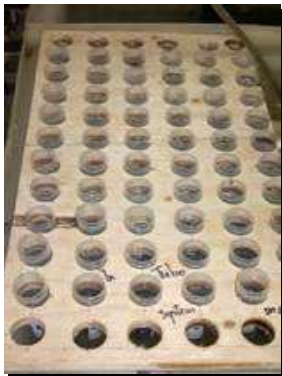


Figure 0.1: mise en place du dispositif *in tubo*

## Utilisation



*Mussel in tubo*

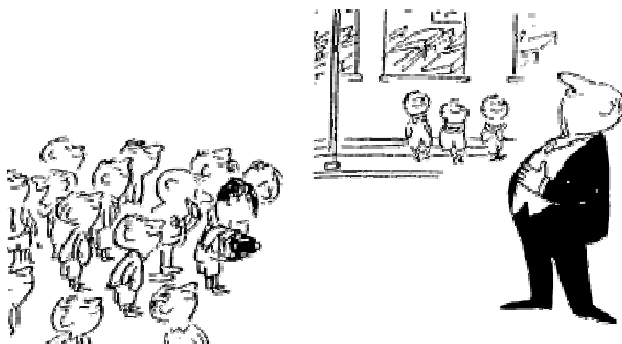


**Avertissement:** On nous a souvent demandé ce que nous faisons comme travail de recherche. Malgré tous nos efforts pour rester vagues et un peu compréhensibles, nos parents, nos amis répliquaient invariablement à nos explications: 'oui, oui...' en soupirant plus ou moins, plus intrigués que jamais. Aussi nous sommes nous résignés à raconter aux masses étonnées non pas notre travail, mais ce qu'est la vie du thésard. Il semblerait que nous ayons réussi, à en croire les premières réactions.

# Le petit Nicolas en thèse

## Le Directeur de Thèse

Pour commencer une thèse, il faut avoir un patron. Un patron, c'est un monsieur très, très fort qui me pose un problème et qui va m'aider à le résoudre. Là, c'est mon patron



photographié par Christian Mercatier-Bresson.

## La Recherche

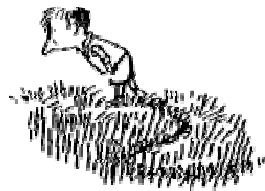
Au début, c'est tellement compliqué, on n'y comprend rien.



**THEOREME 1.** - On a l'inégalité

$$\sum_{n \in G} \frac{|K_n|(|K_n| - 1)}{K^2} \log \left( \frac{|K_n| - 1}{K - |K_n|} \right) + \frac{K-1}{K^2} \sum_{\sigma \in G} \sum_{n \in K_\sigma} |\log |\sigma \alpha_n|| \\ \leq \left(1 - \frac{1}{K}\right) \frac{2D}{K} \sum_{n=1}^N n |\alpha_n| + \frac{D^2}{K} \left(1 + \frac{|G|}{2D} + \log \frac{K}{2}\right)$$

On peut passer des heures et des heures à chercher sans rien trouver. Dans ces moments-là, mon papa et ma maman sont drôlement inquiets et quand ma maman demande si c'était une bonne idée de faire faire une thèse au petit (c'est moi), mon papa ouvre la bouche sans parler, il agite les bras, et il s'en va lire le journal dans le salon.



## La Découverte

Des fois, c'est super, parce que je découvre des trucs que mon patron m'avait demandés. Evidemment, ça peut arriver à n'importe quelle heure, et mes parents ne sont pas toujours ravis.

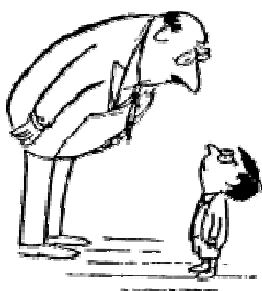






Ils se demandent si je ne deviens pas complètement fou, mais ma maman sait que mon papa n'aime pas qu'elle le lui dise.

Moi, je trouve ça plutôt normal d'être content. D'ailleurs, quand mon patron trouve un théorème, il est super fier et ses copains (qui sont aussi des gens très, très forts) sont super contents de lui. Mais ça mes parents, ils ne le savent pas.



Des fois aussi, ça se passe mal, parce que je me trompe. Et quand je me trompe, avec mon patron, ça ne rigole pas, mais alors pas du tout. 'Regardez-moi dans les yeux, Nicolas', il me dit, pas content du tout. 'Vous appelez ça du travail, peut-être ?' qu'il me demande. Eh ben, là, ça a l'air d'une question, mais il ne faut surtout pas répondre, parce que sinon, il se fâche tout rouge !

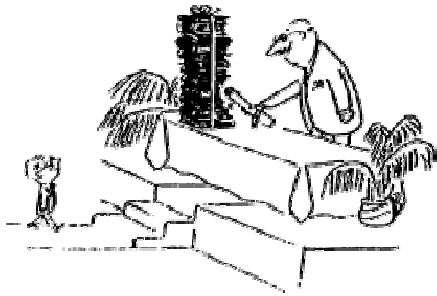
## Les Séminaires

De temps en temps, un monsieur très, très important et vachement fort (mais pas aussi fort que mon patron, quand même) vient nous parler de trucs super-complicés. ça s'appelle



un séminaire, et pendant un séminaire, ça ne rigole pas non plus. Quand le monsieur a fini de parler, mon patron lui pose des tas de questions très compliquées, et il ne sait pas toujours répondre. Et là c'est pas juste, parce que lui, il ne se fait pas disputer !

## La Soutenance

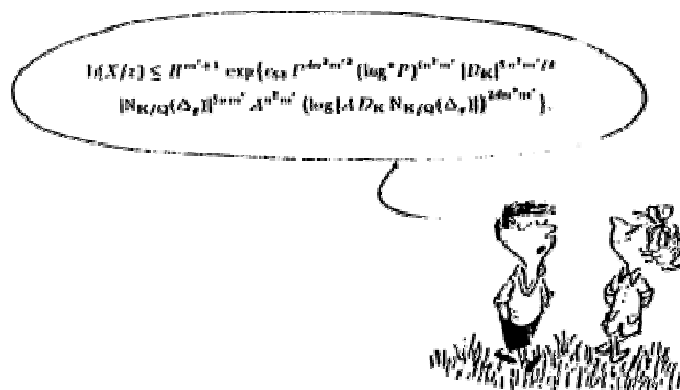


Quand j'aurai fini, il y aura une grande cérémonie avec plein de gens très, très forts (il y aura même d'autres patrons, c'est dire) et il y aura un vieux monsieur très, très important qui me dira que c'est très bien, mon petit, les chemins de la Recherche me sont glorieusement ouverts et je suis l'honneur de mes parents et l'orgueil de mon pays, et tout le baratin. Et après, il y aura un super goûter avec tous mes amis. Génial !

Et quand il lira tout cela dans le journal, mon papa sera très fier et ma maman sera tellement contente qu'elle me servira deux fois de la crème renversée, mon dessert préféré. C'est vraiment super, une thèse, à la fin !



## La Gloire



D'ailleurs les filles, ça les impressionne drôlement de savoir qu'on a fait une thèse de mathématiques et qu'on a trouvé des tas de théorèmes compliqués et tout, et tout. Même la maman de Marie-Edwige, elle me fait des grands sourires maintenant, alors qu'elle trouvait que j'étais un petit garçon très turbulent.



Respectons notre planète. Ne pas jeter sur la voie publique.

---